
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE MATERIALES

Nanomateriales para terapia e imagen en el infrarrojo

Memoria presentada por:

Blanca del Rosal Rabes

para optar al grado de:

Doctor en Ciencias Físicas

Directores de Tesis:

Daniel Jaque García

Francisco Sanz Rodríguez

Madrid, 1 de diciembre de 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE MATERIALES

Nanomaterials for bioimaging and therapy in the infrared

Thesis report presented by:

Blanca del Rosal Rabes

To obtain the degree of:

Doctor en Ciencias Físicas

PhD thesis advisors:

Daniel Jaque García

Francisco Sanz Rodríguez

Madrid, December 1st 2016

Resumen

En esta tesis doctoral se aborda el estudio de nanopartículas fluorescentes como agentes de contraste para imagen por fluorescencia en modelos animales, así como su aplicación en terapia térmica controlada.

La imagen por fluorescencia ha jugado un papel fundamental en la investigación biomédica, haciendo posible el estudio de una gran variedad de procesos a nivel celular. No obstante, también se ha convertido en una valiosa herramienta a nivel clínico, utilizándose, por ejemplo, para evaluar el flujo sanguíneo, diagnosticar patologías oculares o delimitar campos quirúrgicos. Para estas aplicaciones se ha recurrido en algunos casos a la fluorescencia intrínseca de los tejidos (autofluorescencia); y en la mayoría de ellos, a agentes de contraste externos (fluoróforos). Los fluoróforos más habitualmente utilizados, como son la mayoría de colorantes orgánicos, presentan bandas de excitación y emisión en los rangos ultravioleta o visible del espectro electromagnético, lo que supone una limitación a la hora de realizar imagen en profundidad. Como se explica en esta tesis, la penetración de la luz en los tejidos biológicos depende fuertemente de la longitud de onda, siendo máxima en ciertas zonas del infrarrojo cercano, conocidos como ventanas biológicas.

Los nanomateriales estudiados en esta tesis, puntos cuánticos (QDs) de PbS/CdS/ZnS y nanopartículas (NPs) dopadas con iones Nd^{3+} , presentan bandas de excitación y emisión en las ventanas biológicas, lo que nos ha permitido aplicarlas con éxito para realizar imagen de fluorescencia en profundidad en modelos animales. Asimismo, las propiedades espectroscópicas de estos materiales, concretamente la posición de sus bandas de emisión y, en el caso de las NPs dopadas con iones Nd^{3+} , su larga vida media (del orden de microsegundos) nos han permitido desarrollar técnicas para obtener imágenes libres de autofluorescencia. Antes del desarrollo de esta tesis, la autofluorescencia en el infrarrojo no había sido estudiada en profundidad y sin embargo, es un factor fuertemente limitante a la hora de obtener imágenes de alto contraste.

Por último, en esta tesis doctoral se han empleado con éxito nanopartículas de carácter multifuncional, con propiedades de interés para su aplicación en biomedicina más allá de la imagen de fluorescencia. Concretamente, estudiamos la posibilidad de utilizar estas NPs simultáneamente como agentes calentadores y termométricos en terapia fototérmica de tumores malignos, de forma que permitieran determinar la temperatura intratumoral en tiempo real durante el tratamiento. Antes del desarrollo de esta tesis, en la comunidad científica se venía utilizando habitualmente termografía infrarroja para determinar la temperatura superficial del sitio tratado, y por tanto no se había llevado a cabo ninguna medida de temperatura intratumoral durante terapia fototérmica. Para este propósito, las NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ y los QDs de $\text{PbS}/\text{CdS}/\text{Zn}$ resultaron ser candidatos idóneos debido a su eficiencia de conversión fototérmica y a la sensibilidad térmica de su banda de emisión. Con ambos sistemas, como veremos más adelante, conseguimos tratar de forma efectiva tumores malignos en modelos murinos, al mismo tiempo que registramos la temperatura intratumoral durante todo el tratamiento. Los resultados obtenidos indican la importancia de monitorizar esta temperatura para optimizar el control del tratamiento, ya que la temperatura superficial difiere sustancialmente de la intratumoral, siendo esta última la que presenta relevancia desde el punto de vista terapéutico.

Summary

This PhD thesis deals with the application of fluorescent nanoparticles as contrast agents for fluorescence imaging in animal models, as well as their use in controlled photothermal therapy.

Fluorescence imaging has played a most relevant role in biomedical research, allowing the study of a great variety of structures and processes at the cellular level. It has also become a valuable tool at the clinical level, as it can be used in diagnosis of ophthalmological diseases, angiography and determination of resection margins in surgery. For these applications, most cases require external contrast agents (fluorophores), although the intrinsic fluorescence of tissues (autofluorescence) can be sometimes utilized. The most widely used fluorophores, such as the great majority of organic dyes, present absorption and emission bands in the ultraviolet or visible ranges of the electromagnetic spectrum. This constitutes a limiting factor in the applicability of fluorescence for deep tissue imaging. As will be explained in detail later, penetration depth of light into tissues is extremely wavelength-dependent. To achieve the highest possible penetration, systems which operate in certain spectral ranges in the near-infrared, known as biological windows, must be used.

This thesis deals with the study of the applicability of two different nanosized materials, PbS/CdS/ZnS quantum dots (QDs) and neodymium-doped nanoparticles (NPs). The absorption and emission bands of both systems lie in the biological windows, enabling us to achieve deep tissue imaging in living mice. These materials also present spectroscopic properties which make autofluorescence-free imaging possible, such as the position of their emission bands and, in the case of Nd³⁺-doped NPs, their long lifetimes (in the order of microseconds). Taking advantage of these features, we have developed techniques for removing the autofluorescence background during *in vivo* fluorescence imaging. Prior to the work carried out in this thesis, there were no in-depth studies concerning autofluorescence in the infrared. This

has proven to be, however, a highly limiting factor for obtaining high contrast *in vivo* fluorescence images.

Finally, multifunctional NPs, whose applicability in biomedicine goes beyond infrared fluorescence imaging have also been studied in this doctoral thesis. Both Nd³⁺-doped NPs and QDs have been successfully applied for simultaneous photothermal heating and temperature sensing in tumor therapy. Thus, we were able to determine the temperature at the tumor site in real time during the treatment. The most widespread method to monitor temperature during photothermal therapy up to this moment was infrared thermography, which provides a temperature reading at the surface of the tumor site. No actual measurements of the intratumoral temperature had been carried out prior to the works presented in this thesis. Nd³⁺-doped LaF₃ and PbS/CdS/ZnS QDs were especially suitable for this purpose, as they present both a remarkable photothermal conversion efficiency and a temperature-sensitive emission band.

Both systems proved themselves useful for effective tumor therapy in a mouse model, while they provided a continuous temperature reading throughout the treatment. The great discrepancy found between surface and intratumoral temperatures point out the need for monitoring the latter, which is the relevant parameter from a therapeutic point of view.

Índice de abreviaturas

BW – Ventana biológica

BW-I – Primera ventana biológica (650-950 nm)

BW-II – Segunda ventana biológica (1000-1350 nm)

BW-III – Tercera ventana biológica (1500-1800 nm)

DLS – *Dynamic Light Scattering* (Scattering Dinámico de Luz)

FIM – Imagen por fluorescencia

IR – Infrarrojo

l_p – Longitud de penetración

NP – Nanopartícula

QD – *Quantum Dot* (punto cuántico)

RER – Tasa de intercambio respiratorio

TEM – Microscopía Electrónica de Transmisión

Resumen	5
Summary	7
Índice de abreviaturas	9
1. Introducción	15
1.1. Motivación	16
1.2. Termometría de fluorescencia	23
1.3. Terapia fototérmica	26
2. NPs fluorescentes en las ventanas biológicas	31
2.1. NPs dopadas con iones Nd^{3+}	32
2.1.1. Propiedades de fluorescencia de NPs dopadas con Nd^{3+}	32
2.1.2. Procesos no radiativos: NPs dopadas con iones Nd^{3+} como agentes fototérmicos	36
2.1.3. NPs dopadas con iones Nd^{3+} como termómetros de fluorescencia	38
2.2. QDs con emisión infrarroja	40
2.2.1. Efectos de confinamiento y propiedades ópticas	40
2.2.2. Procesos no radiativos: QDs como agentes fototérmicos	44
2.2.3. QDs para termometría de fluorescencia	46
3. Técnicas experimentales	51
3.1. Espectroscopía óptica	52
3.1.1. Espectroscopía de absorción	52
3.1.2. Espectroscopía de fotoluminiscencia	52
3.1.3. Espectroscopía resuelta en tiempo	53
3.2. Imagen de fluorescencia en el infrarrojo	53
3.2.1. Imagen en el infrarrojo: técnica de filtrado espectral	55
3.2.2. Imagen en el infrarrojo: técnica de filtrado temporal	56
3.3. Termografía infrarroja	57
3.4. Experimentación in vitro	58

3.5. Experimentación in vivo	59
3.5.1. Bioimagen y biodistribución	61
3.5.2. Experimentos en jaula metabólica (Phenomaster)	64
3.5.3. Terapia fototérmica	65
3.6. Síntesis de NPs	69
3.6.1. Síntesis de QDs de PbS/CdS/ZnS	71
3.6.2. Síntesis de NPs dopadas con iones Nd^{3+}	72
4. Imagen in vivo en el infrarrojo	77
4.1. Autofluorescencia en las ventanas biológicas	78
4.2. Imágenes de alto contraste mediante filtrado espectral	84
4.2.1. Imágenes de alto contraste mediante filtrado espectral obtenidas con NPs dopadas con iones Nd^{3+} .	84
4.2.2. Imágenes de alto contraste mediante filtrado espectral obtenidas con QDs	90
4.3. Imágenes de alto contraste mediante filtrado temporal con NPs dopadas con iones Nd^{3+}	97
4.4. Experimentos de biocompatibilidad de las NPs usadas para bioimagen	105
5. Terapia fototérmica controlada	115
5.1. Terapia fototérmica controlada mediante NPs dopadas con iones Nd^{3+}	116
5.1.1. Nanopartículas de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$	117
5.1.2. Nanopartículas de NdVO_4	124
5.2. Terapia fototérmica controlada mediante QDs	132
5.2.1. QDs de PbS/CdS/ZnS como nanotermómetros fluorescentes	132
5.2.2. QDs de PbS/CdS/ZnS como agentes fototérmicos	134
5.2.3. Estabilidad de los QDs al calentamiento	135
5.2.4. Simulación de terapia fototérmica con medida de temperatura en tiempo real	137
5.2.5. Terapia fototérmica con QDs en un modelo murino de tumor	138

6. Conclusiones	145
Bibliografía	155

1. Introducción

1.1. Motivación

La imagen por fluorescencia (FIM por sus siglas en inglés, *Fluorescence Imaging*) se basa en el uso de marcadores fluorescentes (que emiten luz de una determinada longitud de onda bajo excitación óptica) como agentes de contraste para visualizar distintos procesos y estructuras a nivel celular (*in vitro*) o en organismos vivos (*in vivo*). A lo largo de la última década, la FIM se ha convertido en una herramienta imprescindible para la investigación biomédica. Numerosos avances en biomedicina han ido de la mano del gran desarrollo de la microscopía de fluorescencia, que desde su introducción a principios del siglo XX ha permitido el estudio en profundidad de una gran variedad de estructuras y procesos a nivel celular [Lippincott-Schwartz 2001, Weissleder 2008]. Durante las últimas décadas, la constante evolución en el desarrollo de los detectores, fuentes de excitación, sistemas ópticos y *software* de análisis, que ha dado lugar a la aparición de nuevas técnicas basadas en la fluorescencia como elemento de contraste (microscopía multifotónica, microscopía de superresolución...). Un resumen de los acontecimientos más relevantes en el desarrollo de la FIM se muestra, en forma de línea del tiempo, en la **Figura 1.1**. El otro factor clave en el avance de la imagen por fluorescencia lo constituye el desarrollo de los métodos de síntesis química, que ha posibilitado la aparición de fluoróforos con propiedades especialmente interesantes para la investigación biomédica (proteínas fluorescentes, compuestos fotoactivables...).[Chalfie 1994, Patterson 2014] En este apartado cobra especial interés la fabricación de nanoestructuras fluorescentes (puntos cuánticos de semiconductor, nanopartículas basadas en carbono...), cuyas propiedades ópticas son en muchos aspectos superiores a las de los colorantes orgánicos, los fluoróforos utilizados más habitualmente para imagen de fluorescencia. Con respecto a los colorantes orgánicos, las nanoestructuras fluorescentes destacan por su elevada estabilidad frente al deterioro fotoquímico y la posibilidad de sintonizar su longitud de onda de emisión mediante el control de su morfología y/o composición.[Sharma 2006] Gracias al continuo desarrollo en las técnicas de imagen y en la síntesis de nuevos nanomateriales fluorescentes, la FIM constituye en la actualidad un campo de creciente interés para la comunidad científica. Esto se refleja en el continuo aumento del número de

publicaciones al año cuyo tema principal es la imagen de fluorescencia, tal y como puede apreciarse en la **Figura 1.2**.

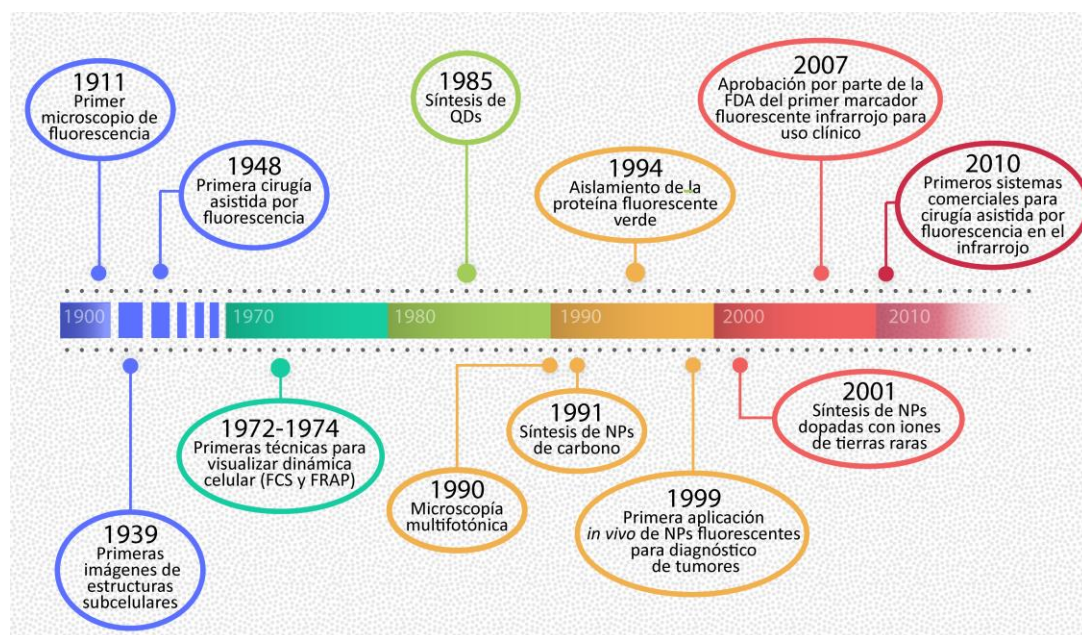


Figura 1.1. Hitos principales en el desarrollo de la imagen por fluorescencia para aplicaciones en biomedicina, incluyendo avances en instrumentación y técnicas de imagen, síntesis de materiales fluorescentes y aplicaciones clínicas de la imagen de fluorescencia.

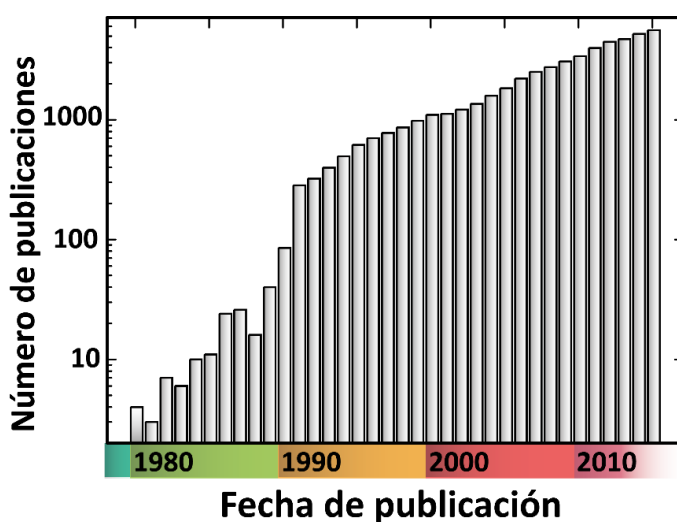


Figura 1.2. Número de publicaciones al año (desde 1980 hasta 2015) en el campo de la imagen por fluorescencia

A pesar de que la microscopía de fluorescencia constituye la aplicación más desarrollada y extendida de la FIM en biomedicina, la aplicabilidad de este tipo de imagen no está limitada a estudios *in vitro*. Durante las últimas décadas, se ha explorado su aplicación clínica, tanto a nivel quirúrgico como diagnóstico.[Andersson-Engels 1997, Nguyen 2010] La imagen por fluorescencia constituye una herramienta especialmente adecuada para delimitar los márgenes de resección en intervenciones oncológicas, así como para monitorizar el flujo sanguíneo (concretamente, en angiografías retinales y cerebrales) y en el mapeo de nodos linfáticos.[Frangioni 2003, Gioux 2010, Vahrmeijer 2013] Además de las aplicaciones ya en fase clínica, la imagen por fluorescencia está siendo utilizada en distintos campos de investigación en modelos animales, por ejemplo, en medicina regenerativa, en ensayos de biodistribución y farmacocinética y en el estudio de enfermedades neurodegenerativas. [Cowles 2013, Patterson 2014]

Frente a otras técnicas de imagen ya ampliamente estudiadas y establecidas en la práctica clínica (resonancia magnética, tomografía computerizada...) la imagen por fluorescencia presenta varias ventajas, entre las que destacan su relativa simplicidad, el bajo coste del equipamiento necesario y la ausencia de radiaciones ionizantes. No obstante, como podemos ver en la **Figura 1.3**, donde se resumen las principales ventajas y limitaciones de las distintas técnicas de imagen utilizadas en biomedicina, la imagen por fluorescencia presenta dos importantes inconvenientes. En primer lugar, su baja profundidad de penetración debida a la absorción y al esparcimiento o *scattering* de la luz por parte de los tejidos biológicos; y en segundo lugar, la autofluorescencia intrínseca de éstos, que supone un problema a la hora de obtener imágenes por fluorescencia con una buena relación señal/ruido.[Weissleder 2008, Lee 2012]

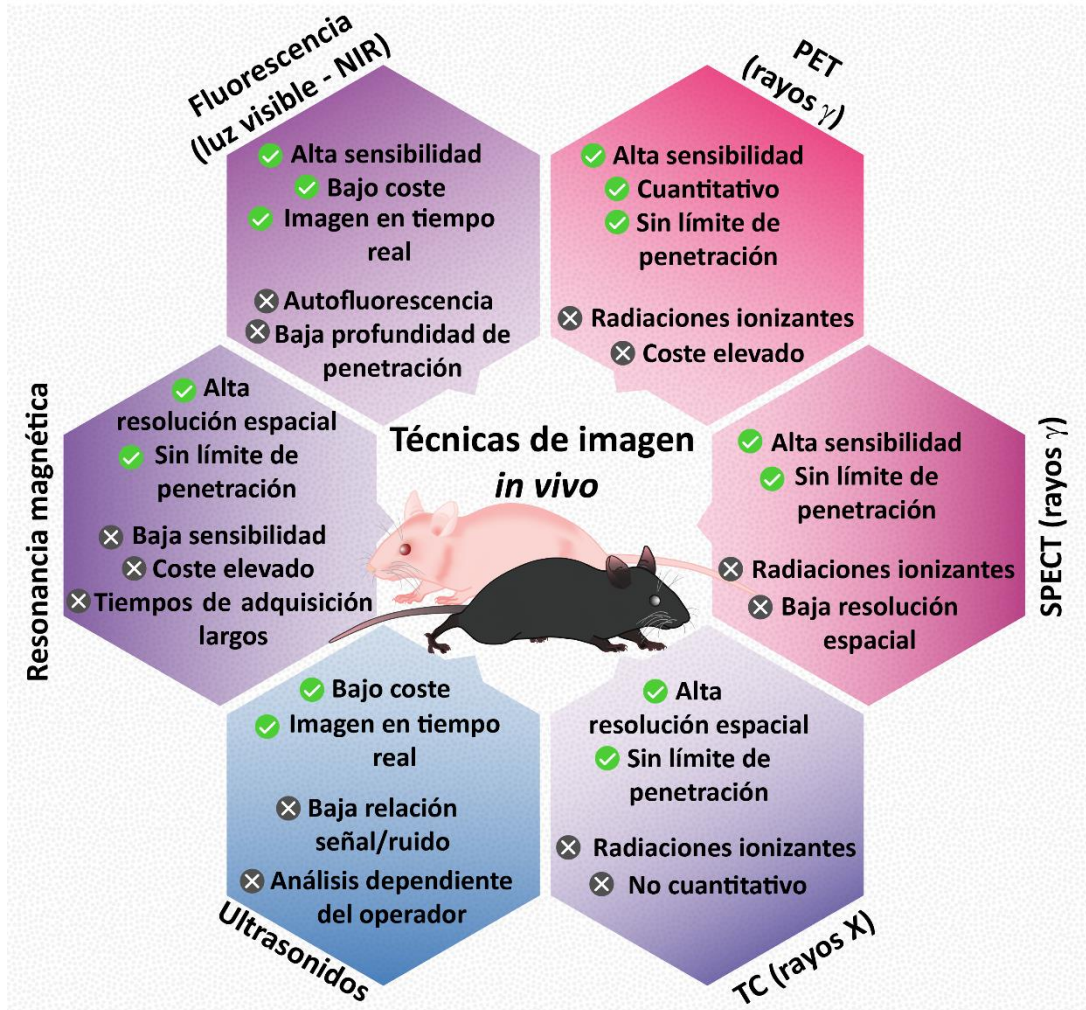


Figura 1.3. Principales ventajas y limitaciones de las distintas técnicas de imagen utilizadas para aplicaciones biomédicas: imagen por fluorescencia, PET (tomografía por emisión de positrones), SPECT (tomografía computerizada de emisión monofotónica), TC (tomografía computerizada), imagen por ultrasonidos y resonancia magnética.

No obstante, estas dos limitaciones que presenta la FIM resultan menos relevantes si se trabaja con marcadores fluorescentes que operen en rangos determinados del espectro electromagnético. En la **Figura 1.4 (a)** se representan tres imágenes de fluorescencia obtenidas *ex vivo* para un ratón, en el que no se ha introducido ningún agente de contraste fluorescente, en diferentes rangos de longitudes de onda de excitación y emisión. Se puede apreciar una gran disminución de la autofluorescencia al aumentar la longitud de onda de excitación y emisión. La señal emitida por los

propios tejidos (790-830 nm) bajo excitación infrarroja (725-775) nm es mínima en comparación a la observada en el rango visible. Es en este rango, no obstante, donde operan los fluoróforos típicamente utilizados.

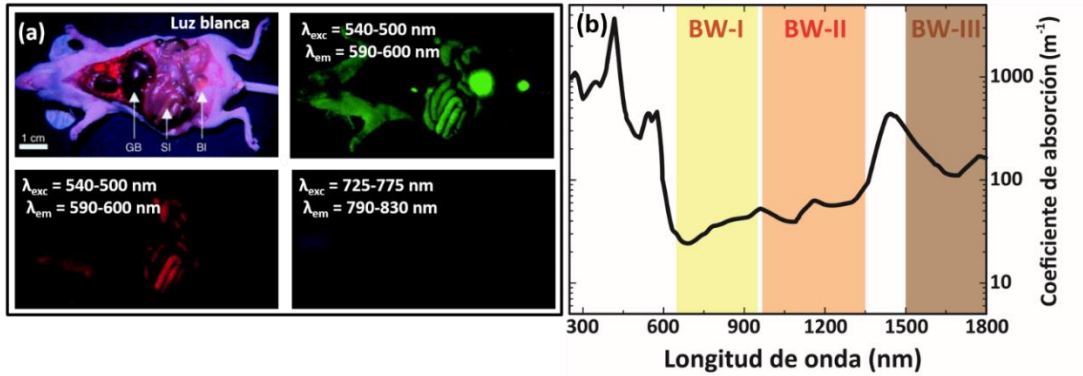


Figura 1.4. Autofluorescencia y absorción en tejidos biológicos. (a) Autofluorescencia medida *ex vivo* en tres rangos de longitud de onda de excitación y emisión para un ratón desnudo cuyos órganos se han expuesto después del sacrificio, como se muestra en la imagen óptica de la esquina superior izquierda. Figura adaptada de [Frangioni 2003]. (b) Coeficiente de absorción de un tejido biológico representativo. Se indican los rangos espectrales correspondientes a las ventanas biológicas (BW-I, BW-II y BW-III).

Además de la gran autofluorescencia presente en el visible, existe una gran absorción de la luz por parte de ciertos componentes de los tejidos biológicos, principalmente la hemoglobina y la desoxihemoglobina. Esto se puede observar claramente en la **Figura 1.4 (b)**, donde se representa el espectro de absorción de un tejido biológico representativo (con contenido de agua y hemoglobina), la absorción es muy elevada para longitudes de onda inferiores a 650 nm. Esto resulta en una muy baja penetración de la luz en los tejidos biológicos, con una longitud de penetración (l_p) que no alcanza el milímetro.[Bashkatov 2005] Para maximizar l_p , es necesario recurrir a agentes de contraste cuyas bandas de excitación y emisión se encuentren en el infrarrojo, concretamente en los rangos espectrales conocidos como ventanas biológicas (BW por sus siglas en inglés). En la **Figura 1.4 (b)** aparecen indicadas las BWs, correspondientes a los siguientes rangos espectrales: 750-950 nm (primera ventana biológica, BW-I), 1000-1350 nm (segunda ventana biológica, BW-II) y 1500-1800 nm (tercera ventana biológica, BW-III). En las BWs, la absorción de los tejidos

biológicos es menor, al tiempo que se reducen la autofluorescencia y el *scattering*. [Jacques 2013] De esta forma, trabajando en las ventanas biológicas es posible optimizar la relación señal/ruido y alcanzar profundidades de penetración superiores al centímetro. [Ntziachristos 2002]

En el año de comienzo de esta tesis doctoral, ya había sido ampliamente demostrado que era necesario utilizar agentes de contraste que operasen en el infrarrojo y no en el visible para realizar imagen por fluorescencia *in vivo* maximizando la relación señal/ruido y la profundidad de penetración. Sin embargo, no existía una gran variedad de sistemas (ni agentes de contraste ni sistemas de detección adecuados) que operasen en el infrarrojo, y los que lo hacían estaban limitados a la primera ventana biológica. [Pansare 2012] En este rango espectral opera el colorante orgánico ICG (*indocyanine green*), que constituye el único fluoróforo aprobado hasta el momento para su uso clínico por parte de la FDA (*United States Food and Drug Administration*). Si bien este margen espectral es adecuado para obtener imágenes de fluorescencia *in vivo*, es posible optimizar aún más el proceso utilizando marcadores capaces de operar en las otras ventanas biológicas. Como vemos en la **Figura 1.4 (b)**, esto no está relacionado con una menor absorción de los componentes de los tejidos biológicos (de hecho, la absorción del agua es mínima en la primera ventana biológica). El motivo por el que la profundidad de penetración de la luz en los tejidos es máxima para longitudes de onda en las otras dos ventanas biológicas se debe, principalmente, a la reducción del *scattering* al aumentar la longitud de onda. La dependencia del *scattering* de la luz en los tejidos biológicos es diferente para cada tipo de tejido, ya que depende de las características específicas de éste (proporción relativa de agua y hemoglobina, contenido de grasa...). No obstante, siempre disminuye con la longitud de onda, λ , siguiendo una expresión de la forma $1/\lambda^x$, donde el exponente x varía según el tipo de tejido. No obstante, siempre disminuye al aumentar la longitud de onda. [Jacques 2013] Teniendo en cuenta los valores de *scattering* y absorción de los distintos tejidos biológicos, se estima que la segunda ventana biológica es la más adecuada para conseguir una penetración máxima de la luz (del orden de 1 cm) en los tejidos. [Lim 2003, Bashkatov 2005] Dado que ninguno de los colorantes orgánicos utilizados hasta

el momento como agentes de contraste para imagen por fluorescencia opera en estas longitudes de onda, para maximizar la penetración es necesario recurrir a nanopartículas (NPs) fluorescentes. En la última década, se ha demostrado la posibilidad de obtener imágenes de alto contraste utilizando diversos materiales, incluyendo los nanotubos de carbono y las NPs de Ag_2S , cuya emisión se encuentra en la segunda ventana biológica. [Welsher 2011, Hong 2012] Con este tipo de agentes de contraste se ha demostrado, por ejemplo, la posibilidad de monitorizar, en tiempo real y de forma no invasiva, el flujo sanguíneo cerebral en un modelo murino de oclusión arterial.[Hong 2014]

En la primera parte de esta tesis, como se explicará en detalle en el capítulo 4, se estudió la posibilidad de utilizar distintos tipos de NPs (concretamente, nanocristales dopados con iones Nd^{3+} y QDs de PbS/CdS/ZnS) para obtener imágenes de alto contraste *in vivo*, al tiempo que se desarrollaron técnicas para obtener imágenes libres de autofluorescencia.

La aplicabilidad de las NPs en el ámbito biomédico, no obstante, no está limitada a la realización de imágenes de fluorescencia con alto contraste y profundidad de penetración. Su mayor ventaja con respecto a los marcadores fluorescentes de tipo molecular, como los colorantes orgánicos tradicionalmente utilizados, reside en la posibilidad de combinar distintas funcionalidades (imagen, diagnóstico, terapia, transporte de fármacos...) en una misma NP.[Liong 2008] Al contrario de lo que ocurre con los marcadores moleculares, las propiedades de las NPs pueden ajustarse para aumentar su especificidad, es decir, para dirigir las de la forma más eficaz posible a los tejidos objetivo. Por un lado, la optimización de los parámetros fisicoquímicos de las NPs, como su tamaño y carga superficial, permiten mejorar la acumulación de NPs en ciertos tejidos, como los tumores en desarrollo, lo que se conoce como *targeting* pasivo. Además, también pueden dirigirse a receptores celulares específicos (*targeting* activo) a través de la conjugación de moléculas específicas en su superficie. Todos estos factores hacen que las NPs presenten un gran potencial de aplicación no únicamente como agentes de contraste en FIM sino como plataformas multifuncionales en biomedicina, pudiendo actuar simultáneamente como agentes diagnósticos y

terapéuticos. [Lee 2012] Algunos nanomateriales están ya presentes en el ámbito clínico, habiendo sido validados por la FDA para su uso en distintos campos (transporte de medicamentos antitumorales, vacunas, imagen...), al tiempo que otros materiales y aplicaciones se encuentran en fase de estudio clínico.[Anselmo 2016]

En esta tesis, además de abordar el estudio de nanomateriales fluorescentes en las ventanas biológicas y el desarrollo de técnicas para obtener imágenes libres de autofluorescencia, exploramos también la posibilidad de utilizar NPs fluorescentes como agentes multifuncionales para calentamiento y termometría en terapia fototérmica de tumores. Concretamente, estudiamos sistemas fluorescentes que fuesen capaces de producir un calentamiento selectivo del tejido tumoral y, simultáneamente, medir en tiempo real su temperatura a través de su fluorescencia. Los fundamentos más importantes de la termometría de fluorescencia y de la terapia fototérmica para el tratamiento de tumores se describen a continuación.

1.2. Termometría de fluorescencia

La termometría de fluorescencia, que constituye una de las aplicaciones más exploradas de las NPs fluorescentes, es un método de no contacto capaz de proporcionar medidas de temperatura con excepcional resolución espacial (submicrométrica) y térmica (inferior a 0.5 °C). Esta técnica requiere la incorporación, en el sistema cuya temperatura se quiere caracterizar, de nanomateriales fluorescentes que permitan medir la temperatura a través de cambios en su emisión. Para ello, es necesario que alguna de las propiedades de la fluorescencia de estos materiales (intensidad, posición del máximo de emisión, forma de la banda, vida media...) varíe de forma apreciable con la temperatura en el rango de interés biológico. Distintos compuestos fluorescentes, incluyendo colorantes orgánicos, proteínas fluorescentes y una gran variedad de NPs (metálicas, dieléctricas dopadas con iones de tierras raras, QDs...) presentan una emisión dependiente de la temperatura y se han utilizado exitosamente para realizar medidas térmicas. [Jaque 2012]

La termometría de fluorescencia resulta de especial interés en campos en los que los métodos de termometría convencionales (de contacto) no pueden aplicarse, por

ejemplo, en el estudio de dispositivos microelectrónicos, en fotónica integrada o en biomedicina.[Allison 1997, Aigouy 2005] En este último campo, la termometría de fluorescencia resulta especialmente interesante ya que un gran número de procesos bioquímicos de elevada importancia a nivel celular (expresión génica, procesos metabólicos, división celular...) van acompañados de cambios de temperatura.[Zohar 1998] Por tanto, la investigación biomédica ha constituido el ámbito de mayor aplicación de la termometría de fluorescencia en la última década, permitiendo determinar, por ejemplo, la existencia de un gradiente de temperatura dentro de la célula o la heterogeneidad de la producción de calor intracelular tras un shock de Ca^{2+} . [Maestro 2010, Yang 2011, Okabe 2012]

El interés de la termometría de fluorescencia no está limitado, sin embargo, al estudio de procesos a nivel celular, sino que constituye también una técnica potencialmente útil en el ámbito clínico. En primer lugar, podría ser utilizada como herramienta para el diagnóstico de algunas enfermedades, incluyendo el desarrollo de tumores malignos, procesos inflamatorios o patologías cardiovasculares, que llevan aparejados cambios de temperatura.[Collins 1974, Ng 2009, Toutouzas 2009] Por otro lado, la termometría de fluorescencia podría servir para monitorizar la temperatura durante tratamientos térmicos de tumores malignos, en los cuales la eliminación de los tumores se consigue realizando un incremento de temperatura controlado, como describiremos en detalle en el apartado siguiente. Dado que la temperatura constituye el parámetro clave en este tipo de terapias, hasta el momento se han utilizado distintos métodos para controlarla, incluyendo tomografía computerizada, ultrasonidos e imagen por resonancia magnética.[Saccomandi 2013] Frente a estas técnicas, la termometría de fluorescencia presenta la ventaja de resultar barata y fácil de implementar, requiriendo únicamente una fuente de excitación adecuada para los nanotermómetros y un detector adecuado para monitorizar en tiempo real su emisión.

A pesar de estas ventajas, la aplicación *in vivo* de la termometría de fluorescencia era muy limitada antes del desarrollo de esta tesis. Esto se debe a que la mayoría de los nanotermómetros estudiados hasta entonces operaban en el visible, lo que limitaba su aplicación en modelos animales debido, como explicamos antes, a la baja penetración

de la luz visible en los tejidos biológicos. Por tanto, los primeros trabajos de termometría de fluorescencia *in vivo* se realizaron en organismos semitransparentes, incluyendo larvas de mosca (*D. melanogaster*) y nematodos (*C. elegans*).[Donner 2013, Arai 2015]

En los últimos años, como indicamos anteriormente, se han fabricado numerosas NPs fluorescentes capaces de operar en las ventanas biológicas, algunas de las cuales presentan sensibilidad a la temperatura, como podemos ver en la **Figura 1.5**. En esta gráfica se representan las sensibilidades térmicas de distintos nanotermómetros fluorescentes, donde la sensibilidad térmica, S_r , se define como:

$$S_r = \frac{1}{\Delta} \left| \frac{d\Delta}{dT} \right| \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

donde Δ es el parámetro de la emisión sensible a la temperatura (intensidad, vida media...).

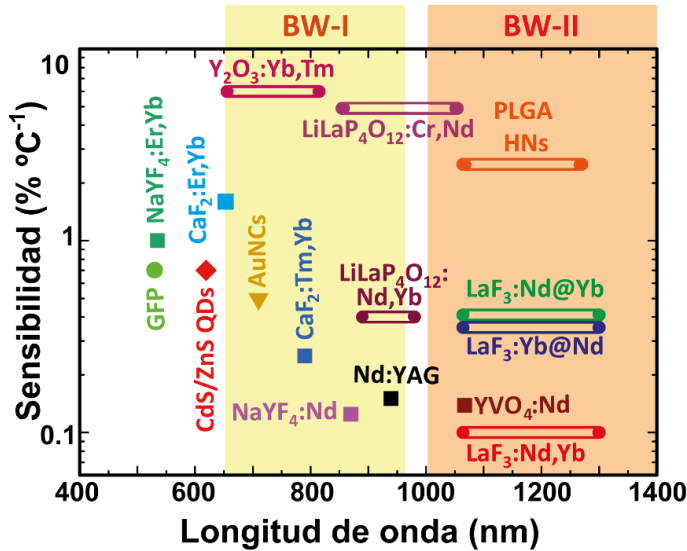


Figura 1.5. Sensibilidad térmica y rangos espectrales de funcionamiento de distintos nanotermómetros fluorescentes. La sensibilidad, S_r , se define como la variación con la temperatura del parámetro sensible a la ésta, Δ , (intensidad, ratio entre picos, anisotropía de polarización) como se indica en la ecuación 1.1. Se representan en la gráfica las ventanas biológicas, correspondientes a los rangos espectrales de máxima penetración de la luz en los tejidos: BW-I (primera ventana biológica, 650-950 nm) y BW-II (segunda ventana biológica, 1000-1350 nm). Figura extraída de [del Rosal 2016]

Podemos ver en la **Figura 1.5** que existe actualmente un gran número de materiales fluorescentes sensibles a la temperatura cuya emisión se encuentra en la primera o en la segunda ventana biológica. Antes del desarrollo de esta tesis, sin embargo, no se había estudiado su posible aplicación para la medida de temperatura en modelos animales. Las primeras aplicaciones *in vivo* de nanotermómetros infrarrojos en modelos animales se llevaron a cabo en esta tesis, tal y como se describe en detalle en el capítulo 5.

1.3. Terapia fototérmica

La terapia térmica consiste en el tratamiento de tumores malignos a través de un incremento de temperatura localizado, con el objetivo de producir un daño irreversible en las células cancerosas al tiempo que se minimiza el efecto sobre los tejidos sanos circundantes. Los efectos del incremento de temperatura sobre el tejido tratado dependen tanto de la magnitud de dicho incremento como de su duración, como se indica en la **Figura 1.6**, donde se resumen los principales efectos de los tratamientos térmicos a diferentes temperaturas. Para valores inferiores a 41 °C no ocurre daño celular, que sí puede producirse de manera irreversible si se alcanzan temperaturas más elevadas. El daño irreversible requiere exposiciones largas (superiores a 1 hora) a temperaturas moderadas (41-48 °C) o exposiciones más breves (4-6 minutos) a temperaturas más altas (48-60 °C). [Habash 2006] En este último intervalo de temperaturas, conocido como rango de ablación térmica, es el que se realizan generalmente los tratamientos de terapia térmica de tumores. La terapia térmica puede utilizarse, además como coadyuvante de tratamientos convencionales (radioterapia, quimioterapia) ya que se ha demostrado que incrementos de temperatura moderados aumentan la susceptibilidad de los tejidos a estos tratamientos. Para este tipo de terapias combinadas, se trabaja habitualmente en temperaturas más bajas (41-48 °C, correspondientes al rango de hipertermia indicado en la **Figura 1.6**). [Takahashi 2002, Chicheř 2007]

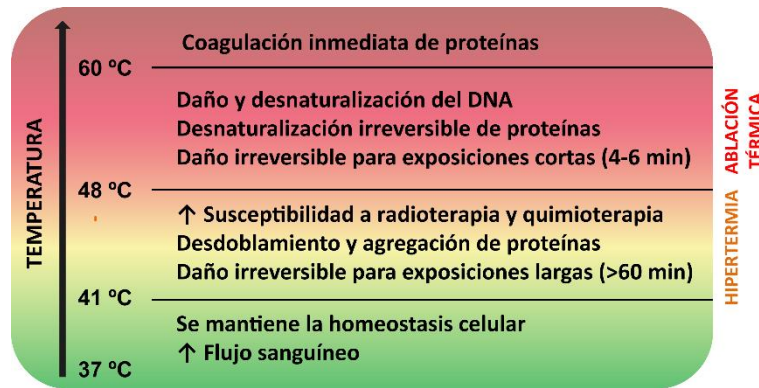


Figura 1.6. Efectos biológicos de los procesos de calentamiento. Resumen de los efectos principales de las terapias térmicas sobre los tejidos tratados. Se indican los rangos habitualmente utilizados para terapia térmica por sí sola (ablación térmica, 48-60 °C) y en combinación con tratamientos convencionales (hipertermia, 41-48 °C).

Aunque la posibilidad de tratar tumores mediante terapia térmica se conoce desde hace décadas, este tipo de tratamientos ha cobrado un renovado interés con el gran desarrollo de la nanotecnología. Mediante la localización en el interior de los tumores de nanopartículas que actúen como focos de calentamiento, es posible realizar un tratamiento mínimamente invasivo, lo cual no era posible con los sistemas de calentamiento tradicionalmente utilizados (radiofrecuencia, microondas y ultrasonidos). [Wust 2002] Para este tipo de terapias térmicas mediadas por NPs se han utilizado, principalmente, nanomateriales magnéticos, que se encuentran en fase de ensayo clínico y cuya capacidad para tratar tumores de forma no invasiva se ha demostrado ampliamente a través de numerosos experimentos *in vivo*. [Hauser 2015] No obstante, el gran desarrollo en los métodos de síntesis de NPs ha dado lugar a la aparición de un gran número de materiales capaces de generar calor bajo excitación óptica, de forma que la terapia fototérmica ha atraído un interés creciente por parte de la comunidad científica en la última década.

La principal ventaja que presenta la terapia fototérmica es su simplicidad de operación y su relativo bajo coste, mientras que su principal limitación reside en la baja penetración de la luz en los tejidos, la cual puede ser maximizada operando con agentes fototérmicos que puedan excitarse dentro de las ventanas biológicas. Este es uno de los requisitos que deben satisfacer las NPs que se pretendan utilizar como agentes

fototérmicos, que deben presentar además una elevada eficiencia de conversión fototérmica (η). Esta se define como la fracción de energía absorbida (bajo excitación con una longitud de onda concreta) que se reemite en forma de calor. Debido a su elevada eficiencia de conversión fototérmica, que puede superar el 90%, las NPs metálicas (principalmente, nanoestructuras de oro) han sido los materiales más estudiados hasta el momento.[Huang 2008] No obstante, existe una gran variedad de nanomateriales para los cuales se han reportado eficiencias de conversión fototérmica elevada, incluyendo nanoestructuras de carbono, NPs semiconductoras, orgánicas y sistemas híbridos en los que se combinan varios tipos de materiales. En cuanto a su aplicación en modelos animales, distintas NPs, entre las que destacan las nanoestructuras de oro, los nanotubos de carbono y las NPs de grafeno han demostrado su potencial para tratar tumores de forma efectiva en modelos animales.[Jaques 2014] Asimismo, también han sido empleadas con éxito para terapias combinadas (terapia fototérmica + quimioterapia o radioterapia) en modelos animales.[James 2004, Shen 2013]

El parámetro clave a la hora de llevar a cabo un tratamiento fototérmico con éxito es la temperatura, ya que el valor de ésta durante el tiempo de irradiación con láser determinará el daño celular en el tumor tratado y en los tejidos sanos circundantes.[Habash 2006] Para controlar la temperatura con precisión, realizar estudios previos al tratamiento no es suficiente, debido a la gran relevancia de parámetros característicos de cada caso individual, como el entorno vascular del tumor o la distribución de NPs calentadoras dentro del mismo en el calentamiento conseguido. Con el propósito de monitorizar la temperatura durante los tratamientos fototérmicos, en la mayoría de experimentos realizados *in vivo* se emplea termografía infrarroja. Este método presenta diversas ventajas, como su sencillez, bajo coste y relativa precisión (alrededor de 1 °C). Sin embargo, no es adecuado para controlar el incremento de temperatura en un tumor localizado en profundidad. Esto se debe a que la termografía infrarroja proporciona únicamente una lectura de la temperatura de la superficie corporal. La temperatura superficial, sin embargo, no tiene por qué corresponderse con la temperatura interior del tumor, debido a la localización de las

NPs calentadoras, así como al flujo sanguíneo existente en el interior del tumor y a los diferentes mecanismos de disipación del calor en la superficie y en el interior de las áreas tratadas. Por tanto, el objetivo de la segunda parte del trabajo desarrollado en esta tesis, como se presentará en el capítulo 0, fue utilizar NPs capaces de actuar como agentes multifuncionales (calentadores y sensores de temperatura) en terapia fototérmica, que presentasen simultáneamente una eficiencia de conversión fototérmica adecuada y una emisión de fluorescencia termosensible. Las propiedades y fundamentos de las NPs utilizadas en terapia fototérmica controlada, así como las del resto de NPs estudiadas a lo largo de esta tesis doctoral, se describirán en el capítulo 2.

2. NPs

**fluorescentes en
las ventanas
biológicas**

En este capítulo se describirán, de forma resumida, las características más destacadas de las NPs que se estudiarán a lo largo de esta tesis (NPs dopadas con iones Nd^{3+} y QDs de PbS/CdS/ZnS). Concretamente, nos centraremos en las propiedades que convierten a estos nanomateriales en sistemas de especial interés para aplicaciones de bioimagen en el infrarrojo. Se prestará especial atención a los fundamentos físicos responsables de las propiedades ópticas de estas NPs y se explicarán, además, los procesos físicos fundamentales que permiten obtener NPs multifuncionales para aplicaciones de interés en biomedicina.

2.1. NPs dopadas con iones Nd^{3+}

Los materiales dopados con iones Nd^{3+} presentan diversas aplicaciones en el campo de la fotónica, constituyendo uno de los sistemas más habitualmente utilizados para láseres de estado sólido.[Svelto 1976, Koechner 2013] Desde la primera observación de acción láser en un cristal dopado con iones Nd^{3+} en 1961, numerosos materiales cristalinos y cerámicos se han utilizado como matrices para iones Nd^{3+} . [Snitzer 1961] En la actualidad, estos láseres de estado sólido se utilizan para una gran variedad de aplicaciones en distintos campos, incluyendo el procesado de materiales y distintas aplicaciones clínicas (cirugía, oftalmología, dermatología...). [Nambiar 2006] No obstante, en la última década se ha explorado también la posibilidad de utilizar NPs dopadas con iones Nd^{3+} como agentes de contraste óptico.[Yu 2008, Chen 2012] En particular, como describiremos en detalle en el siguiente apartado, las propiedades espectroscópicas de las NPs dopadas con iones Nd^{3+} las convierten candidatas idóneas para actuar como agentes de contraste en bioimagen en el infrarrojo.

2.1.1. Propiedades de fluorescencia de NPs dopadas con Nd^{3+}

Los iones trivalentes de tierras raras (RE^{3+}), entre los que se incluye el Nd^{3+} , se caracterizan por presentar espectros de absorción y emisión con bandas estrechas y bien definidas. La posición de estas bandas es, además, prácticamente independiente del entorno cristalino en el que se encuentren los iones. Esto se debe a que los electrones de valencia de los iones RE^{3+} forman parte de suborbitales incompletos 4f,

que se encuentran muy apantallados del entorno por los suborbitales completos más externos 5s y 5p. Como consecuencia, el campo cristalino no producirá un efecto significativo en las posiciones energéticas de los distintos estados de los iones Nd^{3+} . [Wybourne 1965, Henderson 1989] Por tanto, podemos considerar que los iones Nd^{3+} presentarán, independientemente de la matriz cristalina en la que se encuentren, un esquema de niveles de energía muy similar al mostrado en la **Figura 2.1 (a)**. En este diagrama se representan, esquemáticamente, las transiciones entre los niveles $^{2S+1}L_J$, indicándose la longitud de onda correspondiente a cada una de las bandas de absorción y emisión de interés para aplicaciones de bioimagen en el infrarrojo. Como podemos ver en el esquema de niveles, así como en el espectro de emisión característico de un cristal dopado con iones Nd^{3+} obtenido bajo excitación con luz de 808 nm, representado en la **Figura 2.1 (b)**, estos iones presentan bandas de emisión y absorción en ambas ventanas biológicas, BW-I y BW-II. Bajo excitación con luz de longitud de onda de 808 nm (BW-I), se observan bandas de emisión centradas en torno a 900 nm (transición $^4F_{3/2} \rightarrow ^4I_{9/2}$, BW-I), 1060 nm y 1340 nm (transiciones $^4F_{3/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$ y $^4F_{3/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$, respectivamente, correspondientes a la BW-II).

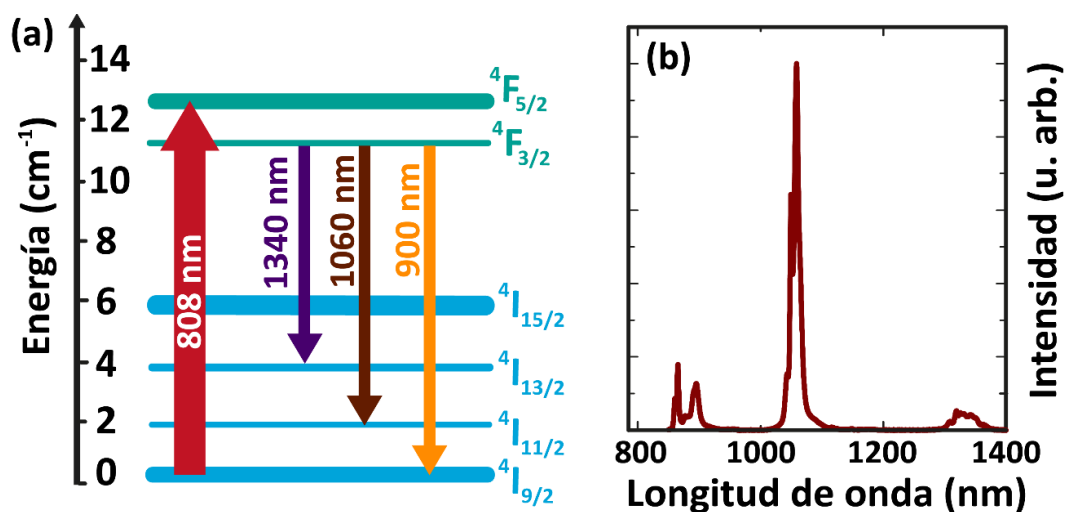


Figura 2.1. Esquema de niveles de energía y espectro de emisión típico de los iones Nd^{3+} . (a) Esquema de niveles adaptado del diagrama original propuesto por Dieke para iones trivalentes de tierras raras en una matriz cristalina de LaCl_3 . [Dieke 1968] (b) Espectro de emisión típico obtenido bajo excitación con luz de 808 nm para un cristal dopado con iones Nd^{3+} .

A la hora de tratar con NPs dopadas con iones de tierras raras, se observa un ensanchamiento de las bandas de absorción y emisión con respecto a los cristales en volumen. Este ensanchamiento indica que existe una gran inhomogeneidad en los campos cristalinos que experimentan los iones dopantes. Esto se puede atribuir a la gran relación superficie/volumen de las NPs, que resulta en una importante contribución de los átomos localizados en la superficie de las NPs a las bandas de absorción y emisión. De esta forma, las NPs de menor diámetro presentan mayores anchuras de banda que las NPs más grandes. [Tanner 2005, Collins 2013] No obstante, a pesar del efecto del tamaño de las NPs en la forma de las bandas de absorción y emisión, la posición espectral de las mismas no se ve muy afectada por la matriz cristalina en la que se introducen los iones. En la **Tabla 2.1**, donde se muestran los máximos de excitación y emisión correspondientes a cada una de las bandas para los distintos nanocristales dopados con iones Nd^{3+} utilizados en el desarrollo de esta tesis, se puede apreciar que la posición de las bandas no varía significativamente al cambiar la matriz cristalina.[del Rosal 2015] En esta tabla se indican, además, las razones de ramificación $\beta_{J,9/2}$, $\beta_{J,11/2}$ y $\beta_{J,13/2}$ de los iones Nd^{3+} en cada una de las matrices cristalinas. Estas razones de ramificación corresponden a la relación entre el número de fotones emitidos desde el estado $^4\text{F}_{3/2}$ a cada uno de los niveles inferiores y el número total de fotones emitidos. Podemos ver que, en todos los casos, la transición más probable ($>70\%$) es la $^4\text{F}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{11/2}$, mientras que a las otras dos transiciones $^4\text{F}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{9/2}$ y $^4\text{F}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{13/2}$, les corresponden probabilidades inferiores ($<20\%$ y $<10\%$, respectivamente).

NP	$\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$ (nm)			Razones de ramificación (%)		
		$^4\text{F}_{3/2} \rightarrow$ $^4\text{I}_{9/2}$	$^4\text{F}_{3/2} \rightarrow$ $^4\text{I}_{11/2}$	$^4\text{F}_{3/2} \rightarrow$ $^4\text{I}_{13/2}$	$\beta_{J,9/2}$	$\beta_{J,11/2}$	$\beta_{J,13/2}$
$\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$	796.4	867.5	1052.2	1324.2	16.1	75.4	8.5
$\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$	794.5	865.2	1058.5	1318.6	16.2	74.6	9.2
$\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$	788.3	863.0	1063.6	1331.0	18.7	73.3	8.0
NdVO_4	804.4	879.2	1063.3	1340.8	19.4	76.9	2.2

Tabla 2.1. Máximos de excitación ($\lambda_{\text{max}}^{\text{exc}}$) y emisión ($\lambda_{\text{max}}^{\text{em}}$) correspondientes a las NPs utilizadas en este trabajo. Se listan los máximos de emisión correspondientes a las tres transiciones de interés para bioimagen en el infrarrojo, así como las razones de ramificación correspondientes a cada una de estas transiciones.

Los cristales dopados con iones Nd^{3+} se caracterizan, además, por presentar vidas medias de fluorescencia relativamente largas. Esto se debe a que las bandas de emisión de los iones Nd^{3+} corresponden no a transiciones permitidas, sino a transiciones forzadas a orden dipolar eléctrico. En principio, las transiciones mostradas en el esquema de la **Figura 2.1** ocurren entre distintos estados $^{2S+1}L_J$ correspondientes a la configuración electrónica $4f^n$ y, por lo tanto, están prohibidas a orden dipolar eléctrico por la regla de paridad de Laporte. No obstante, la acción del campo cristalino resulta en la mezcla de los estados $4f^n$ con estados $4f^{n-1}5d^1$, de paridad opuesta, de forma que se observan transiciones forzadas cuyas probabilidades resultan en tiempos de vida media en el rango de los milisegundos a los microsegundos.[Henderson 1989] En general, las NPs dopadas con iones de tierras raras presentan tiempos de vida media de fluorescencia inferiores a aquellas obtenidas en los mismos materiales en volumen. Esto se debe a la importancia de los efectos de superficie sobre el tiempo de vida media, que resultan especialmente relevantes en el caso de las NPs debido a su gran relación superficie/volumen. Podemos relacionar la reducción en los tiempos de vida media con la presencia de defectos superficiales, así como con las pérdidas no radiativas debido a la interacción de los iones dopantes con el medio en el que se encuentran dispersas las NPs.[Hebbink 2002, Stouwdam 2003, Mialon 2009, Cui 2010] La mayor relevancia de la desexcitación no radiativa en sistemas con una mayor relación superficie/volumen se traduce en tiempos de vida media más cortos para NPs de tamaño más reducido.

No obstante, los tiempos de vida media de las NPs dopadas con iones Nd^{3+} , del orden de los μs , son varios órdenes de magnitud superiores a las de otros agentes de contraste fluorescente: los colorantes orgánicos, por ejemplo, presentan tiempos de vida media del orden de unos pocos ns. [Bouzigues 2011]. Este es también el caso de los compuestos orgánicos responsables de la autofluorescencia observada en sistemas biológicos, como la clorofila o la melanina, cuyos tiempos de vida media no superan los 10 ns.[Berezin 2010] Esta diferencia nos permitirá desarrollar, como veremos en el capítulo 4, un sistema para obtener imágenes infrarrojas de alto contraste libres de autofluorescencia.

2.1.2. Procesos no radiativos: NPs dopadas con iones Nd^{3+} como agentes fototérmicos

Junto con el tamaño de las NPs, que como hemos visto afecta al tiempo de vida media de fluorescencia, la concentración de iones ópticamente activos juega un papel clave en las propiedades de las NPs dopadas con iones de tierras raras. En concreto, se ha demostrado experimentalmente que, para NPs de idéntico tamaño, tanto la intensidad de fluorescencia como el tiempo de vida media dependen de la concentración de iones dopantes. De forma general, se observa que la intensidad de fluorescencia para los nanocristales dopados con iones Nd^{3+} aumenta al aumentar la concentración de iones Nd^{3+} hasta un cierto valor, a partir del cual incrementos adicionales en la concentración de iones resultan en una disminución de la intensidad. Asimismo, se observa que los tiempos de vida media de fluorescencia disminuyen de forma monótona al incrementar la concentración de iones dopantes dentro de las NPs. Esto se debe a que, al aumentar la cantidad de iones Nd^{3+} en la matriz cristalina, se reducen las distancias entre ellos y los procesos de intercambio de energía cobran una mayor relevancia.[Henderson 1989] En la **Figura 2.2** se muestran de forma esquemática, los procesos de desexcitación posibles para un ion Nd^{3+} libre (**Figura 2.2 (a)**) cuando es excitado desde el estado fundamental hasta el nivel $^4\text{F}_{5/2}$ con radiación de 808 nm de longitud de onda, así como los procesos de transferencia de energía entre iones, que pueden ser de dos tipos: relajación cruzada (**Figura 2.2 (b)**) y migración de energía (**Figura 2.2 (c)**). Vemos en esta figura que, en el caso del ion aislado, ocurren procesos de desexcitación no radiativa a través de la emisión de fonones, lo que implica generación de calor en el sistema. Tanto la transición entre el estado excitado y el estado metaestable desde el cual ocurren las emisiones radiativas ($^4\text{F}_{5/2} \rightarrow ^4\text{F}_{3/2}$) como las transiciones entre los niveles terminales de los procesos radiativos $^4\text{I}_J$ ($J = 15/2, 13/2, 11/2$) y el estado fundamental $^4\text{I}_{9/2}$ ocurren de manera no radiativa. Esto indica que, incluso en el caso en el de NPs dopadas con una baja concentración de iones Nd^{3+} , ocurrirá una cierta generación de calor bajo excitación óptica. Los procesos de transferencia de energía proporcionan además mecanismos adicionales de desexcitación no radiativa:

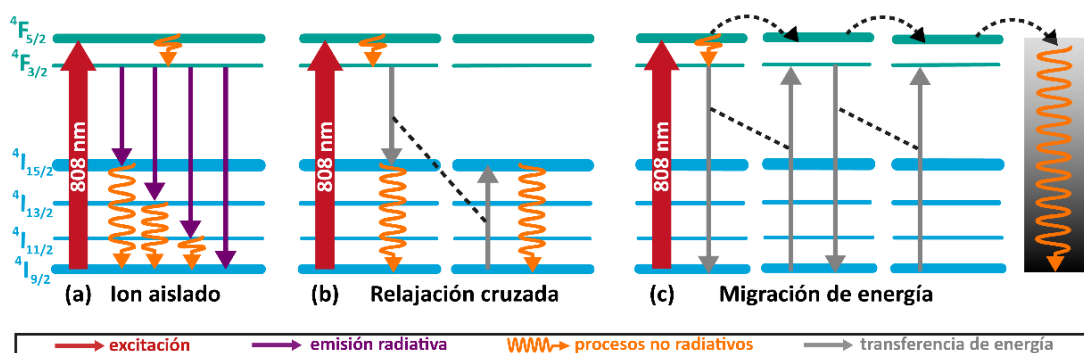


Figura 2.2. Esquema de los procesos de transferencia de energía entre iones Nd^{3+} . (a) Procesos de desexcitación radiativa y no radiativa para iones Nd^{3+} libres (b) Proceso de relajación cruzada entre dos iones Nd^{3+} adyacentes. (c) Proceso de migración de energía entre iones Nd^{3+} , que termina con la desexcitación no radiativa desde un centro no emisor.

- En el caso de los procesos de relajación cruzada entre dos iones Nd^{3+} , que se representan esquemáticamente en la **Figura 2.2 (b)**, la desexcitación ${}^4\text{F}_{3/2} \rightarrow {}^4\text{I}_{15/2}$ de uno de ellos se consigue a través de la excitación del otro ion desde el estado fundamental (${}^4\text{I}_{9/2}$) al estado ${}^4\text{I}_{15/2}$. Ambos iones se desexcitan entonces a través de procesos multifonónicos hasta el estado fundamental.
- Los procesos de migración de energía consisten, como se muestra esquemáticamente en la **Figura 2.2 (c)**, en la relajación de uno de los iones cediendo su energía a otro ion adyacente. Esta transferencia de energía entre iones próximos continúa hasta que se alcanza un centro no radiativo (generalmente asociado con vacantes o defectos en la red), que se desexcita generando calor. La mayor presencia de este tipo de defectos en la superficie de los materiales hace que estos procesos sean especialmente relevantes en el caso de sistemas de tamaño nanométrico.[Quintanilla 2013] Adicionalmente, en el caso de NPs dispersas en medios acuosos, como es el caso de los sistemas utilizados en esta tesis, es necesario tener en cuenta las interacciones entre los iones ópticamente activos localizados en la superficie y las moléculas del solvente. En este aspecto, los grupos hidroxilo (-OH) juegan un papel determinante debido a la alta energía de sus modos vibracionales, de forma

que los iones Nd^{3+} pueden desexcitarse mediante una interacción no radiativa con ellos.[Kumar 2007, Orlovskii 2013] Las NPs dopadas con una alta concentración de iones Nd^{3+} presentarán, por tanto, una alta probabilidad de procesos de transferencia de energía debido a la proximidad de los iones entre sí. Estos procesos resultarán, frecuentemente, en desexcitaciones no radiativas tanto en el interior de la NP como en su superficie (debido a la presencia de defectos superficiales y al acoplamiento con modos vibracionales del medio) y en la consiguiente producción de calor.

La mayor relevancia de los procesos de transferencia de energía en el caso de NPs dopadas con una alta concentración de iones Nd^{3+} resulta en una disminución de la eficiencia cuántica, Φ , de su nivel emisor, que indica la relación entre el número de fotones emitidos y el número de fotones absorbidos. Esto nos indica que la capacidad para generar calor de las NPs dopadas con iones Nd^{3+} será mayor cuanto mayor sea la proporción de iones dopantes. Esto ha sido observado experimentalmente en NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ y $\text{NaYF}_4:\text{Nd}^{3+}$ (dopadas con porcentajes molares de Nd^{3+} en el rango 1-25%). [Bednarkiewicz 2010, Rocha 2014]

2.1.3. NPs dopadas con iones Nd^{3+} como termómetros de fluorescencia

Las propiedades de las NPs dopadas con iones Nd^{3+} nos permiten utilizarlas no sólo como agentes de contraste para imagen por fluorescencia en el infrarrojo, sino también como nanotermómetros no invasivos capaces de medir temperatura a nivel subcutáneo. Esto se debe, como explicaremos a continuación, a la dependencia de la forma de las bandas de emisión del Nd^{3+} con la temperatura.

La posibilidad de utilizar NPs dopadas con iones de tierras raras como nanotermómetros, capaces de proporcionar una lectura de temperatura a través de cambios en su fluorescencia, se planteó por primera vez a comienzos de la pasada década.[Wang 2002] Desde entonces, esta posibilidad se ha demostrado en gran variedad de nanocristales dopados con distintos iones lantánidos gracias a la sensibilidad de alguno de los parámetros de su fluorescencia (intensidad, vida media...) a la temperatura. En algunos casos, se observan cambios asociados a la temperatura en

la intensidad relativa de dos líneas de emisión (correspondientes a un único ion o a varios), dando lugar a lo que se denomina *termometría ratiométrica de fluorescencia*. [Quintanilla 2016] Este es el caso, por ejemplo, de los nanocristales codopados con Er^{3+} e Yb^{3+} , que han sido utilizados con éxito como sensores de temperatura a nivel celular. [Vetrone 2010] La ventaja principal de la termometría ratiométrica reside en la independencia de la lectura térmica de la concentración local de nanotermómetros o de la densidad de potencia de excitación, lo que no ocurre, por ejemplo, en la termometría basada en cambios de intensidad.

Los materiales dopados con iones Nd^{3+} pueden actuar como nanotermómetros ratiométricos en el infrarrojo, permitiendo detectar cambios de temperatura a través de variaciones en la relación entre las intensidades de dos líneas de emisión muy próximas, que vienen determinadas por la población electrónica de cada uno de los niveles emisores. Estas líneas de emisión proceden del desdoblamiento, debido al campo cristalino, de los niveles $^{2S+1}L_J$. El campo cristalino actúa como un campo eléctrico externo sobre los iones Nd^{3+} , produciendo una ruptura parcial de la degeneración de los niveles $^{2S+1}L_J$ por efecto Stark. La pequeña separación energética de estos subniveles Stark (del orden de 10^2 cm^{-1}) hace que estén acoplados térmicamente de forma que la distribución de la población electrónica entre ellos depende de la temperatura. Las poblaciones electrónicas de los dos subniveles vienen pueden describirse a través de la distribución de Boltzmann, de forma que el ratio de intensidades entre las líneas de emisión viene dado por la siguiente expresión:

$$\frac{I_2}{I_1} = B \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad \text{(Ecuación 2.1)}$$

donde I_2 e I_1 corresponden a las intensidades emitidas por los niveles de mayor y menor energía, respectivamente, ΔE a la separación energética entre ellos, k_B a la constante de Boltzmann y T a la temperatura. [Svelto 1976] La constante B viene determinada, principalmente, por la degeneración de cada uno de los niveles y por la probabilidad de emisión espontánea y por tanto depende de la matriz cristalina y de la simetría de los centros ópticamente activos. [Quintanilla 2011, Hufner 2012] A

temperatura ambiente (≈ 300 K), el valor de $k_B T$ (≈ 200 cm⁻¹) es comparable a la separación energética entre los subniveles Stark de los niveles $^{2S+1}L_J$ de los iones Nd³⁺, lo que permite que pequeños cambios de temperatura resulten en redistribuciones de población relevantes entre estos subniveles.

Hasta este momento, se ha demostrado la posibilidad de utilizar distintas NPs dopadas con iones Nd³⁺ como nanotermómetros ratiométricos en la primera ventana biológica, aprovechando los cambios asociados a la temperatura en su banda de emisión correspondiente a la transición $^4F_{3/2} \rightarrow ^4I_{9/2}$. [Wawrzynczyk 2012, Rocha 2013, Benayas 2015]

2.2. QDs con emisión infrarroja

Los puntos cuánticos o *quantum dots* (QDs) de semiconductor constituyen las NPs más ampliamente utilizadas como agentes de contraste para imagen de fluorescencia. Esto se debe a las numerosas ventajas que presentan con respecto a los colorantes orgánicos utilizados habitualmente para este propósito, ya que combinan secciones eficaces de absorción elevadas, que resultan en un alto brillo, con una gran estabilidad fotoquímica. [Michalet 2001] Los QDs se han utilizado con éxito como marcadores fluorescentes para bioimagen *in vitro* e *in vivo*, demostrándose la posibilidad de utilizarlos incluso para realizar marcado selectivo de tumores y para monitorizar el flujo sanguíneo en modelos animales. [Ballou 2004, Gao 2005]

2.2.1. Efectos de confinamiento y propiedades ópticas

Una de las ventajas de los QDs, como hemos indicado anteriormente, reside en las características de su espectro de absorción. Además de presentar elevadas secciones eficaces de absorción, presentan una forma de banda que permite la excitación óptica a diferentes longitudes de onda. Esto no ocurre en el caso de los colorantes orgánicos, que típicamente presentan bandas de absorción estrechas, ni en las NPs dopadas con iones de tierras raras, como se comentó en la sección anterior. [Bruchez 1998] Esto se puede apreciar claramente en la **Figura 2.3 (a)**, donde se representan los espectros de absorción correspondientes a una muestra QDs de CdSe/ZnS (cuya banda emisión está centrada en 545 nm) y una muestra de Rodamina 6G (con una banda de emisión

centrada alrededor de 566 nm), respectivamente. Los picos que se observan en el espectro absorción de los QDs corresponden a transiciones entre los distintos niveles de energía discretos existentes en las bandas de conducción y valencia del material (niveles de energía excitónicos, ver **Figura 2.4**), que aparecen al reducir su tamaño a escala nanométrica, como explicaremos a continuación. Otra de las características particularmente interesante de los QDs es la posibilidad de sintonizar su longitud de onda de emisión a través de ajustes en su composición o en su tamaño, pudiendo obtenerse QDs con bandas de emisión entre 400 y 2000 nm.[Gao 2005] Como ejemplo representativo de la dependencia de la posición espectral de la banda de emisión con el tamaño de los QDs, se muestra en la **Figura 2.3 (b)** una imagen óptica obtenida, bajo excitación con luz ultravioleta, para dispersiones acuosas de QDs de CdSe/ZnS de tamaños en el rango 2-6 nm. Podemos en esta imagen que, para QDs de idéntica composición, la longitud de onda de emisión aumenta con el diámetro de los QDs.

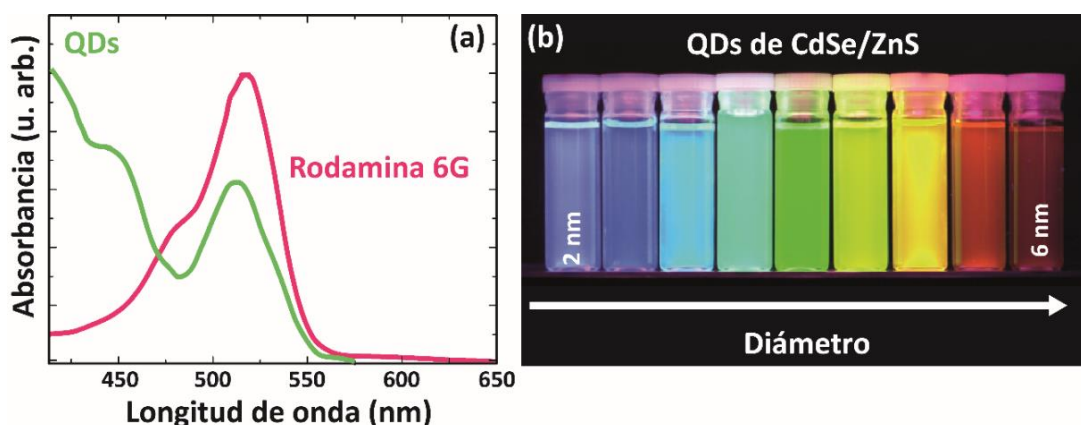


Figura 2.3. Propiedades ópticas de los QDs. (a) Comparación de los espectros de absorción de una muestra de QDs de CdSe/ZnS y una muestra de rodamina 6G. Datos extraídos de [Biju 2010] **(b)** Imagen óptica de la emisión, bajo excitación con luz ultravioleta, de dispersiones acuosas de QDs de CdSe/ZnS de distintos tamaños. Imagen extraída de [Tomczak 2009].

La causa de la gran dependencia de las propiedades ópticas de los QDs con su tamaño se encuentra en los efectos de confinamiento cuántico. De forma general, este tipo de efectos aparecen en un material cuando su tamaño se reduce, en alguna de sus dimensiones, hasta alcanzar un cierto valor umbral. En el caso de los semiconductores,

la dimensión crítica a partir de la cual se observan efectos de confinamiento la determina el radio del excitón de Bohr del material.[Alivisatos 1996] El radio del excitón de Bohr (a_0), que indica la distancia más probable entre los portadores de carga (electrones y huecos) dentro de un semiconductor depende de las propiedades de cada material, de forma que:

$$a_0 = \frac{\hbar \epsilon}{e^2} \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) \quad \text{(Ecuación 2.2)}$$

donde ϵ es la constante dieléctrica del material y m_e^* y m_h^* corresponden a las masas efectivas de electrones y huecos, respectivamente. El radio de Bohr está relacionado con el tamaño de la separación energética entre las bandas de valencia y conducción (*gap* de energía), ya que las masas efectivas son directamente proporcionales a este *gap* de energía. Por lo tanto, los materiales con *gaps* de energía mayores (y, por tanto, masas efectivas más grandes), presentan radios de Bohr más pequeños.[Koole 2014] Para obtener las funciones de onda de los portadores de carga en un QD, es necesario multiplicar las funciones de onda de éstos en un semiconductor en volumen por una función envolvente, que representa la corrección debida al confinamiento espacial de electrones y huecos. Esta función envolvente es la solución a la ecuación de Schrödinger para una partícula confinada en un potencial esférico, que constituye un problema análogo al del átomo de hidrógeno. Los niveles de energía resultantes de esta función corresponden a los niveles discretos de portador de carga confinado en una esfera de diámetro D :

$$E_{n,l}^{conf}(D) = \frac{2\hbar \chi_{nl}^2}{m^* D^2} \quad \text{(Ecuación 2.3)}$$

donde m^* corresponde a la masa efectiva, D al diámetro del potencial esférico y χ_{nl} a las raíces de las funciones esféricas de Bessel dependientes de los números cuánticos n y l . De esta forma, para obtener la energía del *gap* de un QD de diámetro D ($E_g^{total}(D)$), es decir, la separación energética entre las bandas de conducción y valencia del QD, será necesario sumar las energías de confinamiento de los portadores de cargas ($E_{n,l}^{conf}(D)$)

a la del *gap* del semiconductor en volumen, como se indica esquemáticamente en la **Figura 2.4**:

$$E_g^{total}(D) = E_g^0 + E_{n,l}^{conf}(D) = E_g^0 + \frac{2\hbar\chi_{nl}^2}{m_e^*D^2} + \frac{2\hbar\chi_{nl}^2}{m_h^*D^2} \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

Podemos ver, por tanto, que el *gap* de energía de un QD depende del tamaño a través de los términos debidos al confinamiento de los portadores de carga, que varían inversamente con el cuadrado del diámetro del QD. De esta forma, se explica la dependencia de la longitud de onda de la emisión con el tamaño de los QDs: cuanto menor sea el diámetro de éstos, más importante será el confinamiento y mayor el *gap* de energía. Es importante remarcar en este punto que la expresión mostrada en la **Ecuación 2.4** para la energía del *gap* es válida siempre y cuando el radio del QD sea menor que el radio de Bohr del excitón del semiconductor, lo que se conoce como régimen de confinamiento fuerte. En este régimen, la interacción electrostática entre electrón y hueco es despreciable frente al potencial de confinamiento, de forma que los portadores de carga se pueden tratar de manera independiente.

Los QDs utilizados en esta tesis presentan un núcleo (*core*) de PbS. Este material se caracteriza por presentar un *gap* de energía muy pequeño ($E_g^0 = 0.37$ eV) en comparación con los materiales típicamente utilizados para fabricar QDs con emisión en el visible (CdS, CdTe), como se muestra en la **Tabla 2.2**.

Material	E_g^0 (eV)	a_0 (nm)
ZnS	3.68	2.3
CdS	2.42	2.8
CdSe	1.74	4.9
CdTe	1.49	7.5
PbS	0.37	18
PbSe	0.26	46

Tabla 2.2. Energías de *gap* (E_g^0) y radios del excitón de Bohr (a_0) para distintos materiales semiconductores. Datos extraídos de [Prasad 2004, de Mello Donegá 2011]

Como hemos visto antes, el tamaño del gap de energía está relacionado inversamente con el radio del excitón de Bohr, de forma que en un material de *gap* más estrecho será posible observar efectos de confinamiento para QDs de diámetros mayores. Adicionalmente, empleando materiales de *gap* de energía estrecho es posible obtener QDs con bandas de emisión en las ventanas biológicas, lo que resulta especialmente interesante para la aplicación de los QDs como agentes de contraste fluorescente para imagen *in vivo*.

2.2.2. Procesos no radiativos: QDs como agentes fototérmicos

La absorción de un fotón por parte de un QD resulta en la creación de un par electrón-hueco (excitón). Los niveles que ocuparán el electrón y el hueco en las bandas de conducción y valencia, respectivamente, dependen de la energía del fotón absorbido: si ésta es mayor que la energía del *gap*, los portadores de carga pueden ocupar estados excitados. La relajación desde estos estados excitados al estado fundamental dentro de cada una de las bandas ocurre a través de una cascada de procesos no radiativos, como se indica esquemáticamente en la **Figura 2.4 (a)**, de forma extremadamente rápida (< 1 ps).[Klimov 2007] Gracias a estas desexcitaciones no radiativas, es posible utilizar QDs como agentes fototérmicos si son excitados con radiación de energía muy superior a la energía del *gap*.

Además de los procesos intrabanda, es necesario considerar también los procesos de desexcitación interbanda. Una vez en el estado fundamental (que corresponde a los portadores de carga situados en los niveles menos energéticos de cada una de las bandas), el excitón puede recombinarse de forma radiativa (**Figura 2.4 (a)**) o no radiativa, a través de procesos multifonónicos. No obstante, estos procesos, que se muestran esquemáticamente en la **Figura 2.4 (b)**, son muy poco probables debido a que requieren la intervención de un gran número de fonones. Por lo tanto, las transiciones interbanda no radiativas que se observan con mayor frecuencia están asociadas a la localización de los portadores de carga en un defecto o estado de superficie, como se muestra esquemáticamente en la **Figura 2.4 (c)**. Este tipo de

estados se denominan habitualmente *estados trampa*; y desde ellos, la recombinación de los excitones ocurre habitualmente de forma no radiativa.[de Mello Donegá 2011]

Banda de conducción

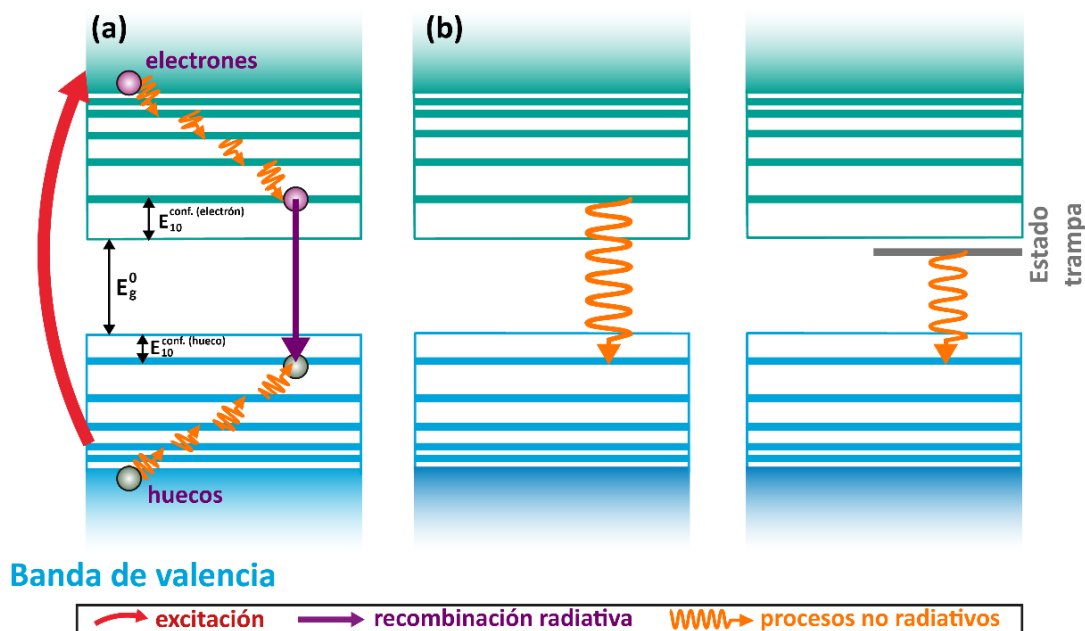


Figura 2.4. Representación esquemática de los procesos de desexcitación en un QD tras ser excitados ópticamente. (a) Recombinación radiativa del par electrón-hueco tras ser excitado con luz de energía superior a la del gap del QD. Se muestra la cascada de procesos no radiativos (intrabanda) a través de los cuales los portadores de carga se relajan rápidamente desde los estados excitados al estado fundamental. Se indican las energías correspondientes al gap del material en volumen (E_g^0) y al primer estado de confinamiento de electrones y huecos (E_{10}^{conf}). (b) Recombinación no radiativa interbanda. (c) Recombinación no radiativa asistida por defectos, que involucran la aparición de estados trampa.

La superficie de los QDs juega un papel fundamental en la presencia de estados trampa debido, en primer lugar, a que los átomos superficiales presentan un menor número de átomos vecinos y presentan, por lo tanto, presentan enlaces “colgantes” que dan lugar a niveles de energía dentro del *gap* de energía del QD (estados de superficie). De la misma forma, los defectos superficiales (por ejemplo, vacantes atómicas), generan estados trampa en los que pueden quedar atrapados los portadores de carga.[Alivisatos 1996] Con el objetivo de minimizar la influencia de los defectos superficiales y optimizar las propiedades de fotoluminiscencia de los QDs, se recurre

habitualmente a la pasivación de la superficie de los mismos. La técnica más utilizada consiste en recubrir los QDs con una capa externa de otro semiconductor con un *gap* de energía más grande, dando lugar a una estructura de tipo *core/shell*. [Dabbousi 1997] Esto permite el confinamiento del excitón en el núcleo del QD, que ya no presenta enlaces colgantes debido a que sus átomos están enlazados a los de la capa externa, evitando su interacción con el entorno. El semiconductor constituyente del *shell* del QD debe de tener, además, un parámetro de red similar al del *core*, para evitar en la medida de lo posible la aparición de defectos debido al desajuste entre los parámetros de red. En algunos casos, con el objetivo de optimizar las propiedades luminiscentes de los QDS, se diseñan estructuras con múltiples *shells*, de forma la diferencia en los parámetros de red de capas adyacentes es pequeña. [Reiss 2009]

2.2.3. QDs para termometría de fluorescencia

Antes del desarrollo de esta tesis, ya se había demostrado la posibilidad de utilizar QDs como nanotermómetros de fluorescencia. [Walker 2003] Se había demostrado también su utilidad para monitorizar la temperatura a nivel celular aprovechando la sensibilidad térmica de su fluorescencia y se había planteado la posibilidad de utilizarlos para controlar la temperatura durante tratamientos fototérmico, aunque no se habían llevado a cabo experimentos *in vivo*. [Han 2009, Jaque 2014] El análisis de la fluorescencia de los QDs permite detectar cambios de temperatura gracias a la sensibilidad térmica de varios de sus parámetros, incluyendo su intensidad de emisión, vida media y posición del pico de emisión. [Jaque 2016]

El desplazamiento en la posición del máximo de emisión, que fue estudiado en gran detalle para QDs de PbS por Olkhovets *et al.*, [Olkhovets 1998], se puede atribuir principalmente a la sensibilidad térmica del primer pico de excitón. La temperatura influye en distintos parámetros que determinan la posición de los picos excitónicos: la dilatación de la red cristalina del QD, la energía de confinamiento y el acoplamiento electrón-fonón son sensibles a la temperatura. De esta manera, la variación de la

posición del primer pico de excitón, $\frac{dE_{1,0}}{dT}$, se puede escribir como la suma de tres contribuciones, como se indica en la **Ecuación 2.5**. [Dai 2010]

$$\frac{dE_{1,0}}{dT} \approx \left(\frac{dE_{1,0}}{dT} \right)_{red} + \left(\frac{dE_{1,0}}{dT} \right)_{conf.} + \left(\frac{dE_{1,0}}{dT} \right)_{electrón-fonón} \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

donde cada uno de los tres términos representa, respectivamente:

- El efecto de la expansión térmica de la red cristalina, que ocurre al aumentar la temperatura, sobre el *gap* de energía del material y por tanto, sobre la energía del primer excitón. La expansión térmica de la red resulta en un aumento de la energía del *gap*.
- El efecto de la temperatura sobre el confinamiento: de forma general, la expansión térmica resulta en un confinamiento menor. Este término se puede expresar teniendo en cuenta el coeficiente de expansión térmica del QD, α , de la siguiente forma:

$$\left(\frac{dE_{1,0}}{dT} \right)_{conf.} = \frac{dE_{1,0}^{conf.}}{dR} \frac{dR}{dT} = \frac{dE_{1,0}^{conf.}}{dR} \cdot \alpha R \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

Teniendo en cuenta la **Ecuación 2.3**, que nos indica que la energía de confinamiento es proporcional a $1/R^2$, siendo R el radio del QD, obtenemos que:

$$\left(\frac{dE_{1,0}}{dT} \right)_{conf.} \propto -2\alpha E_{1,0}^{conf.} \quad (\text{Ecuación 2.7})$$

- El efecto de la temperatura sobre el acoplamiento electrón-fonón, que depende de la energía de los fonones y de la densidad de estados. Estas dos variables aumentan al aumentar la temperatura, resultando en un mayor acoplamiento electrón-fonón. [Olkhovets 1998]

La importancia relativa de cada uno de los términos depende del tamaño del QD, de forma que el primer término es dominante en los QDs de diámetro relativamente

elevado. Al disminuir el tamaño de los QDs, aumenta la separación entre los niveles de energía, que vienen determinados en mayor medida por el tamaño del QD en lugar de por la constante de red del material o por las interacciones electrón-fonón. Por tanto, el término dominante en el caso de QDs de menor tamaño es el que indica el efecto de la temperatura sobre el confinamiento que, como se puede deducir a partir de la **Ecuación 2.7**, implica un desplazamiento a energías más bajas al aumentar la temperatura. Esto explica, por ejemplo, que aumentos de temperatura resulten en el desplazamiento al rojo del pico de emisión observado en QDs de PbS y PbSe de pequeño tamaño (< 5 nm), mientras que QDs de tamaños superiores experimentan un desplazamiento al azul de su emisión.[Olkhovets 1998, Dai 2010]

La posibilidad de medir temperatura aprovechando el desplazamiento del pico de emisión ha sido demostrada utilizando, por ejemplo, QDs de CdSe, con emisión en el rango visible del espectro.[Maestro 2010, Yang 2011] Para obtener una lectura térmica de esta forma, es necesario utilizar un sistema experimental adecuado para monitorizar con precisión la posición del pico de emisión de los QDs. Teniendo en cuenta que el desplazamiento del pico con la temperatura es pequeño ($< 1 \text{ nm} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$ para QDs de CdSe y CdTe de distintos tamaños), es necesario utilizar un sistema que proporcione una elevada resolución espectral.[Martínez Maestro 2015]

Como indicamos anteriormente, la posición del máximo de emisión no es el único parámetro de la luminiscencia de los QDs dependiente de la temperatura, sino que su vida media, ancho de banda de emisión e intensidad también son sensibles a cambios térmicos. La sensibilidad térmica que proporciona esta última nos permite obtener una lectura de temperatura utilizando un sistema experimental mucho más sencillo que en cualquiera de los otros casos. La variación de la intensidad de emisión de QDs con la temperatura ha sido estudiada en una gran variedad de sistemas, incluyendo QDs de tipo *single core* (es decir, constituidos únicamente por un tipo de semiconductor), *core/shell* (con una capa externa de un semiconductor de mayor *gap* de energía que el núcleo) y *core/multishell* (con un núcleo y varias capas externas).[Valerini 2005, Jing 2009, Andreakou 2013] La dependencia térmica de la intensidad de emisión no es constante, sino que varía dependiendo del rango de temperatura. Por ejemplo, en el

caso de los QDs de PbS (*single core*) se pueden distinguir tres rangos de comportamiento bien diferenciados: para temperaturas entre 180 y 250 K, la intensidad aumenta al aumentar la temperatura, mientras que para temperaturas inferiores a 180 K o superiores a 250 K, disminuye al aumentar la temperatura. [Andreaskou 2013] En esta tesis, el interés en la sensibilidad térmica de los QDs está limitada al rango de temperaturas relevantes para aplicaciones biomédicas. En este rango, se observa de forma general una reducción de la intensidad de fluorescencia (*quenching*) al aumentar la temperatura, que indica un aumento de la probabilidad de recombinación no radiativa del excitón para temperaturas más altas. [Walker 2003]

Este aumento de la probabilidad de recombinación no radiativa del excitón a temperaturas más altas (en el rango fisiológico) se puede atribuir a dos mecanismos: el atrapamiento de portadores de carga en estados trampa y el escape térmico de los portadores de carga en procesos asistidos por fonones, concretamente, fonones longitudinales ópticos. [Klimov 1996, Yang 1997] Teniendo en cuenta estos dos procesos, la dependencia con la temperatura de la intensidad de emisión de los QDs, $I(T)$, puede expresarse como:

$$I(T) = \frac{I_0}{1 + A(e^{-E_a/k_B T}) + B(e^{E_{LO}/k_B T} - 1)^{-m}} \quad \text{(Ecuación 2.8)}$$

Donde I_0 es la intensidad de emisión a 0 K, E_a representa la energía de activación de los estados trampa y m es el número de fonones longitudinales ópticos, de energía E_{LO} , involucrados en el escape térmico. Las constantes A y B indican las probabilidades de cada uno de los dos procesos de relajación no radiativa descritos anteriormente. [Valerini 2005] El ajuste de los datos experimentales de intensidad de emisión en función de la temperatura ha permitido estudiar la relevancia de cada uno de estos procesos para distintos tipos de QDs. [Valerini 2005, Morello 2007] Los valores concretos de cada uno de estos parámetros dependen tanto de la composición del QD como de su tamaño, así como de su estructura (*single core*, *core/shell*, *core/multishell*). En los casos de estructuras *core/shell* y *core/multishell*, el espesor de las distintas capas

también juega un papel relevante en los procesos de recombinación no radiativa.[Jing 2009]

Adicionalmente, se ha demostrado que el *quenching* térmico de QDs es reversible únicamente en un cierto rango de temperaturas, de forma que si se supera una cierta temperatura umbral (T_q), la pérdida de fluorescencia es irreversible. Este proceso fue estudiado por Zhao *et al.* de forma exhaustiva en QDs de estructura *core/shell/shell* de CdSe/CdS/ZnS y en QDs de estructura *core/shell* de CdTe/CdSe dispersados tanto en solventes líquidos como en matrices sólidas.[Zhao 2012] Los autores atribuyen la irreversibilidad del *quenching* térmico para temperaturas superiores a T_q a la aparición de cambios estructurales en los QDs por encima de esta temperatura, que dan lugar a su vez a la creación de estados trampa permanentes. Por debajo de esta temperatura, los portadores de carga pueden quedar atrapados en estados trampa preexistentes, como indicamos antes, o en estados trampa creados térmicamente que pueden relajarse al bajar la temperatura, lo que hace el *quenching* ocurra de forma totalmente reversible. Los autores observaron que tanto la variación de la intensidad con la temperatura como el valor de T_q eran fuertemente dependientes no sólo del tipo de QDs sino también del medio en el que se éstos encontraran dispersos. Concretamente, observaron un *quenching* térmico más pronunciado y con un valor muy inferior de T_q para los QDs de CdSe/CdS/ZnS dispersos en un medio líquido que para los mismos QDs en una matriz sólida. Este resultado se puede atribuir a la aparición de defectos superficiales debido a la pérdida de moléculas del ligando que recubre la superficie de los QDs, que no puede ocurrir para QDs dispersados en marices sólidas.[Bullen 2006]

Teniendo en cuenta la gran variedad de factores que afectan a la sensibilidad térmica de los QDs, a la hora de utilizarlos para experimentos de nanotermometría resulta especialmente importante calibrar la dependencia térmica de la fluorescencia en todo el rango de temperaturas de interés a través de repetidas rampas de enfriamiento y calentamiento. Asimismo, resulta crítico realizar la calibración con los QDs dispersos en el medio en el que van a ser utilizados para considerar el posible efecto del entorno en la sensibilidad térmica.

3. Técnicas experimentales

3.1. Espectroscopía óptica

En este apartado se describirán los montajes experimentales y el instrumental utilizado para caracterizar las propiedades espectroscópicas de los materiales estudiados en esta tesis, concretamente su absorción, fotoluminiscencia y tiempo de vida media.

3.1.1. Espectroscopía de absorción

Los espectros de absorción se obtuvieron mediante un espectrofotómetro de doble haz, Perkin Elmer Lambda 1050, que se encuentra equipado con un fotomultiplicador para la detección espectral en el rango de 200 a 860 nm, un detector de InGaAs refrigerado por efecto Peltier para el rango de 860 a 1800 nm y un detector de PbS refrigerado para el rango de 1800 a 3300 nm. La resolución de este espectrofotómetro es de 0.2 nm.

3.1.2. Espectroscopía de fotoluminiscencia

Para obtener los espectros de emisión en el infrarrojo de las distintas NPs utilizadas, así como de los componentes orgánicos responsables de la autofluorescencia en el infrarrojo, utilizamos un microscopio de montaje propio. Como fuente de excitación utilizamos, en todos los casos, un láser de diodo de 808 nm (Lumics) acoplado a fibra y conectado a un colimador (Thorlabs PAFA-X-4-B). El haz láser, tras ser reflejado en un espejo dicróico, se focalizaba en la muestra mediante un objetivo de microscopio (50X IR, apertura numérica 0.55). La luminiscencia era recogida por el mismo objetivo de microscopio y, tras atravesar el espejo dicróico, que filtraba la radiación correspondiente al láser de excitación, era analizada espectralmente mediante un monocromador y finalmente recogida por una cámara CCD. Para el análisis espectral de la emisión de las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$, se utilizó un monocromador HORIBA iHR500 y una cámara CCD Synapse HORIBA con detector de silicio. El resto de espectros de emisión se registraron mediante un sistema compuesto por un monocromador Andor Shamrock 193i y una cámara CCD de InGaAs Andor iDus DU490A. Para el registro de los espectros, se utilizó el software proporcionado por los fabricantes de los respectivos detectores: LabSpec5 y Andor SOLIS.

En los experimentos de espectroscopía de emisión que requerían mantener la muestra a una temperatura fija, montamos sobre la platina del microscopio una platina Peltier termoeléctricamente refrigerada (Linkam PE120). Este sistema nos permite seleccionar, con una precisión de 0.1 °C, temperaturas en el rango -25-120 °C.

Los espectros de excitación fueron medidos, en cambio, utilizando un láser de Ti:zafiro (Spectra Physics 3900) bombeado por un láser de diodo (Spectra Physics Millennia eV). El láser de Ti:zafiro, sintonizable en el rango 700-1000 nm, se focalizó en las muestras utilizando una única lente de 5 cm de distancia focal. La señal de emisión fue analizada espectralmente por un monocromador SPEX 500M y recogida por un detector de InGaAs.

3.1.3. Espectroscopía resuelta en tiempo

Para la medida de tiempos de vida media de luminiscencia, se utilizó como fuente de bombeo un oscilador paramétrico óptico (Spectra Physics MPO-730, que genera pulsos de 10ns con una tasa de repetición de 10 Hz) operando a 790nm. Para bombear el MPO, se utilizó un láser pulsado de Nd:YAG (Quanta Ray CG-230) operando a 355 nm. Al igual que para obtener los espectros de excitación, la emisión fue filtrada espectralmente utilizando un monocromador Spex 500 M. La detección de la emisión se realizó en este caso mediante un fotomultiplicador de GaAs (Hamamatsu R636). Para medir las curvas de decaimiento de la luminiscencia, se utilizó un osciloscopio digital Lecroy Waverunner LT372, con un ancho de banda de 500 MHz.

3.2. Imagen de fluorescencia en el infrarrojo

Para los experimentos de imagen en el infrarrojo, utilizamos el sistema experimental básico que se muestra esquemáticamente en la **Figura 3.1(a)**, compuesto por un láser de 808 nm como fuente de excitación y una cámara de InGaAs para recoger las imágenes. Para minimizar el ruido, aislamos el sistema del exterior mediante una caja negra de metracrilato. El sistema incluía una placa calentadora en la base, cuyo

objetivo principal era evitar la bajada de temperatura corporal de los animales durante los experimentos *in vivo*.

En todos los experimentos de imagen se utilizó como fuente de excitación el mismo diodo láser (LIMO) acoplado a una fibra de 0.22 de apertura numérica. Este láser es capaz de proporcionar potencias de hasta 10 W y de funcionar en modo continuo o pulsado. En todos los experimentos, se seleccionó la densidad de potencia deseada regulando tanto la corriente eléctrica aplicada al diodo (5-20 A) como la distancia entre la fibra y la superficie a irradiar.

El detector de la cámara de InGaAs, modelo Xeva-1.7-320, como se muestra en la **Figura 3.1 (b)**, permite detectar radiaciones con longitud de onda en el rango 900-1700 nm. Para focalizar la imagen en el detector, utilizamos en todos los casos una óptica específica para longitudes de onda en el infrarrojo cercano (Optica Kowa LM 35mm SWIR). Entre ésta y la cámara, colocamos un filtro de paso alto de 850 nm (Thorlabs FEL850) para evitar cualquier señal de fondo debida al láser de 808 nm utilizado para la excitación.

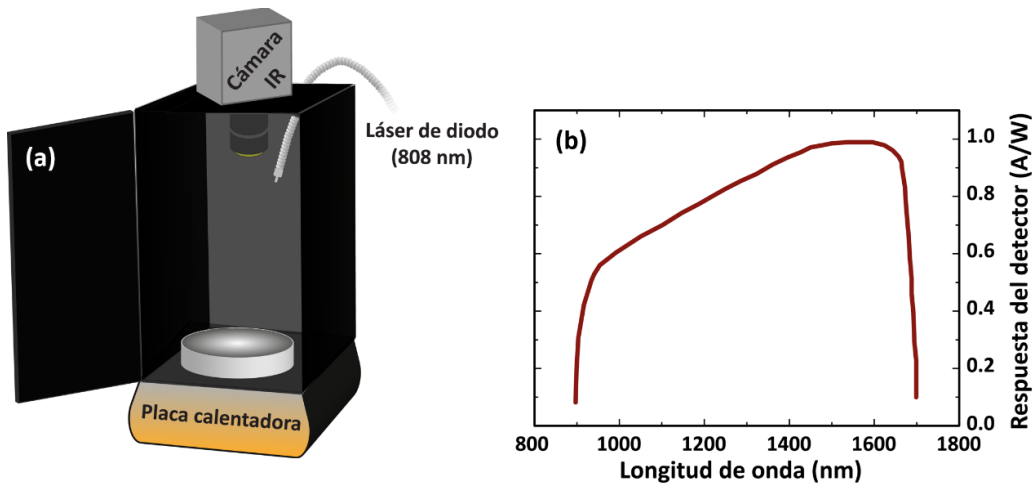


Figura 3.1. Sistema de imagen IR. (a) Esquema experimental del sistema básico de imagen infrarroja, compuesto por un láser de diodo de 808 nm como fuente de excitación y una cámara infrarroja como sistema de detección, con la óptica adecuada para estas longitudes de onda. Una placa calentadora y una caja de metacrilato completan el sistema. (b) Curva de sensibilidad del detector de InGaAs de la cámara infrarroja utilizada.

3.2.1. Imagen en el infrarrojo: técnica de filtrado espectral

La técnica de filtrado espectral, que nos permitió estudiar la dependencia de la autofluorescencia con la longitud de onda (sección 4.1) y obtener los resultados expuestos en la sección 4.2, se basa en restringir el rango de longitudes de onda detectado por la cámara. Para este propósito, modificamos el montaje anterior añadiendo una rueda de filtros motorizada (Thorlabs FW102C) en el camino de detección. Como se muestra en la **Figura 3.2**, la rueda de filtros se situó delante de la óptica utilizada para focalizar la imagen en el detector de InGaAs. Esta rueda de filtros, cuyo movimiento se controlaba por ordenador a través del *software* específico del fabricante, permitía montar hasta seis filtros diferentes. En los experimentos en los que aplicamos esta técnica, se utilizaron seis filtros de paso alto de longitud de onda de corte en el rango 900-1400 nm (gama FEL de Thorlabs). En este tipo de experimentos, trabajamos en todo momento con el diodo de 808 nm en modo continuo.

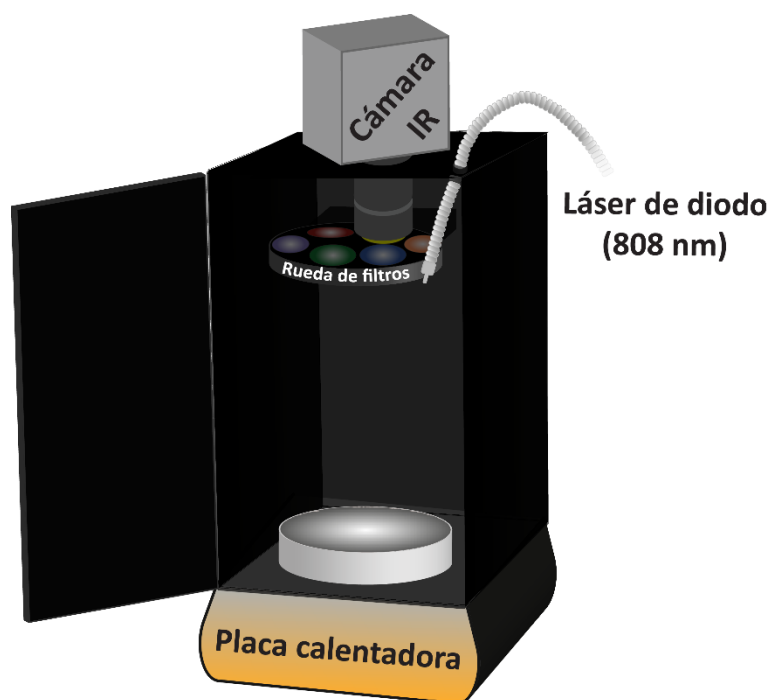


Figura 3.2. Sistema de imagen infrarroja con filtrado espectral. Al sistema experimental de imagen infrarroja básico, representado en 3.1, se le añadió una rueda de filtros motorizada delante de la óptica con el objetivo de filtrar el rango de longitudes de onda detectado por la cámara infrarroja.

3.2.2. Imagen en el infrarrojo: técnica de filtrado temporal

En el caso de los experimentos de imagen utilizando la técnica de filtrado temporal, cuyos resultados describimos en la sección 4.3, prescindimos de la rueda de filtros. En este caso, trabajamos con el láser de diodo en modo pulsado, de forma que el final del pulso láser actuase, con un cierto retraso, como disparador (*trigger*) de la cámara infrarroja. Para introducir este retraso recurrimos a un circuito diseñado y fabricado en el Servicio de Electrónica del SEGAINVEX de la UAM, que nos permite regular manualmente el tiempo de retraso entre el final del pulso láser y la adquisición de la imagen entre 1 y 200 μs . Para ello, como se muestra esquemáticamente en la **Figura 3.3 (a)**, conectamos la salida del disparador del láser al circuito retardador, denotado como *trigger delay* en la figura. A su vez, la salida de este *trigger delay* se conectaba a la entrada del disparador de la cámara. Para ajustar el tiempo de retraso, conectamos además ambos puertos del circuito retardador a un osciloscopio (LeCroy Waverunner LT372). En la **Figura 3.3 (b)** se muestra, esquemáticamente la relación entre la salida del *trigger* del láser pulsado, la salida del *trigger delay* y el funcionamiento de la cámara infrarroja.

En la **Figura 3.3 (c)** podemos ver en detalle el esquema del circuito electrónico del retardador de pulso utilizado. Este sistema, basado en dos fases RC y puertas lógicas inversoras, genera un pulso de salida con un retraso y anchura ajustables respecto al pulso de entrada. En la primera parte, un integrador RC constituido por D1, R1, Pdelay y C1, retrasa la subida del pulso de entrada de acuerdo con la constante de tiempo, que se puede ajustar externamente a través del potenciómetro Pdelay. En una segunda fase, un diferenciador RC, compuesto por D2, R3, Pwidth y C2, determina la longitud del pulso de salida. Para asegurar la estabilidad de las constantes de tiempo en ambas fases, se utilizaron condensadores con una tolerancia del 5%, igual que la de las entradas de los inversores lógicos. Estos inversores son de tipo disparador Schmitt, lo que permite que cambios lentos en las señales en estas fases generen pulsos estables, bien definidos y sin oscilaciones indeseadas, lo que permite generar tiempos de retraso cortos, en este caso, un mínimo de 1 μs .

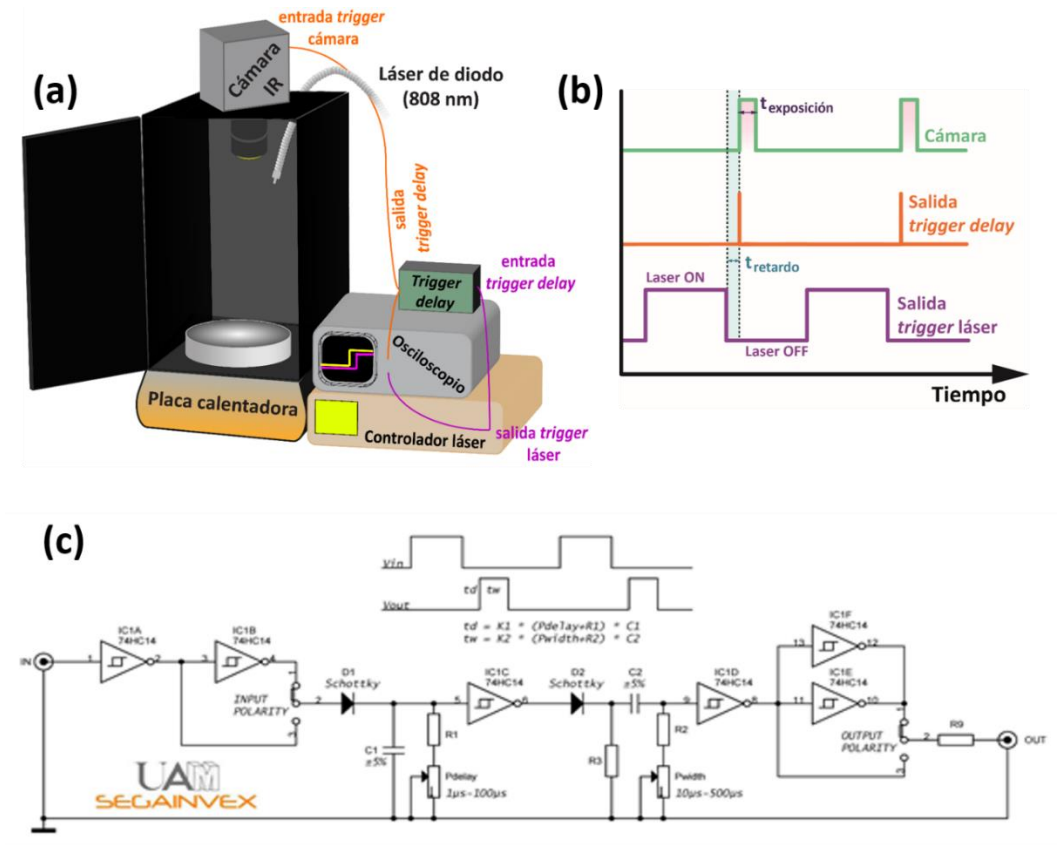


Figura 3.3. Equipo de imagen infrarroja con filtrado temporal. (a) Representación esquemática del sistema experimental, cuyas modificaciones con respecto al sistema experimental básico de la figura 2.1 son la utilización del láser de diodo en modo pulsado y la incorporación de un osciloscopio y un circuito retardador del pulso (*trigger delay*). (b) Representación esquemática de la relación entre los pulsos de salida del láser, los pulsos de salida del circuito retardador (*trigger delay*) y la adquisición de la imagen por parte de la cámara. (c) Esquema del circuito retardador del pulso fabricado por el Servicio de Electrónica del SEGAINVEX UAM.

3.3. Termografía infrarroja

Durante el desarrollo de esta tesis, hemos utilizado termografía infrarroja para determinar fácilmente la tempera superficial en los experimentos de terapia fototérmica *in vivo*. Asimismo, hemos utilizado esta técnica para estudiar el efecto fototérmico de distintas NPs, tanto en experimentos *ex vivo* como en dispersiones de NPs con el objetivo de determinar su eficiencia de conversión fototérmica. Para registrar las imágenes térmicas se ha utilizado una cámara termográfica FLIR E40 bx

controlada por ordenador a través del software FLIR Tools. Esta cámara permite obtener imágenes térmicas con una precisión de 2 °C en el rango -20-120 °C.

3.4. Experimentación *in vitro*

Para evaluar la toxicidad a nivel celular de las NPs utilizadas en este trabajo, se utilizó en todos los casos el ensayo del MTT, un procedimiento colorimétrico que permite medir viabilidad celular. Las células metabólicamente activas son capaces de reducir el anillo de tetrazolio del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), una sal soluble en agua coloreada de color amarillo, generando formazan, un compuesto insoluble en agua de color azul oscuro. Los cristales de formazan son solubles en un medio orgánico, como el dimetilsulfóxido (DMSO), de manera que se pueden cuantificar a partir de la absorción óptica de la dispersión a 540 nm y correlacionar el valor obtenido con el número de células vivas.[Berridge 2005]

En todos los experimentos realizados en esta tesis, la viabilidad celular fue estudiada utilizando la línea celular HeLa. Para llevar a cabo estos ensayos, las células fueron cultivadas en una placa con 24 pocillos a 37 °C en atmósfera controlada (5% de CO₂). Después de 48 horas, se retiró el medio de cultivo, reemplazándose por medio completo nuevo en el que se habían dispersado previamente NPs a las concentraciones deseadas. Las células fueron incubadas en este medio con NPs durante periodos de entre 2 y 48 horas. Al finalizar este periodo de incubación, el medio de cultivo con NPs fue desechado y reemplazado por medio sin NPs. Después de 24 horas, se añadió a cada pocillo 0.5 mL de una dispersión de MTT (0.05 mg·mL⁻¹) y se continuó la incubación en atmósfera controlada durante 3 horas, después de las cuales se desechó el medio de cultivo. Los cristales de formazan se solubilizaron a continuación en 0.5 mL de DMSO (Merck).

Finalmente, la densidad óptica de la muestra a 540 nm se midió utilizando un lector de microplacas (Espectra Fluor 4, Tecan). A partir de ella se determinó el porcentaje de viabilidad de las células incubadas con NPs con respecto al caso control utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Viabilidad}(\%) = \frac{A_{NPs}}{A_{Control}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

A la hora de determinar las concentraciones de NPs necesarias para los ensayos de toxicidad celular previos a los experimentos en modelos animales, se tuvo en cuenta la cantidad mínima de NPs necesaria para obtener imágenes infrarrojas con suficiente contraste. Teniendo en cuenta este dato, junto con el volumen de sangre total del ratón ($58.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), estimamos la concentración de NPs que se pretendía alcanzar en sangre en cada uno de los casos de inyección intravenosa de las NPs. Las concentraciones para los ensayos de toxicidad se eligieron de forma que fueran iguales o superiores a la concentración de NPs en sangre en los experimentos animales.

3.5. Experimentación *in vivo*

Durante el desarrollo de esta tesis se han realizado diversos experimentos en modelos animales (ensayos *in vivo*), para todos los cuales se han utilizado ratones (*Mus musculus*) con varios propósitos bien diferenciados:

- Estudiar la autofluorescencia intrínseca de los tejidos murinos en el infrarrojo y la posible relación de ésta con la pigmentación cutánea.
- Evaluar la posibilidad de utilizar distintas NPs como fluoróforos para imagen *in vivo* en profundidad.
- Estudiar, tanto *in vivo* como *ex vivo*, la biodistribución de distintas NPs mediante imagen por fluorescencia *in vivo* llevando a cabo experimentos en tiempo real y mediante análisis *ex vivo* de los órganos tras el sacrificio de los ratones.
- Realizar terapia fototérmica controlada en un modelo murino de tumor utilizando NPs dopadas con iones Nd^{3+} o QDs de PbS/CdS/ZnS.
- Evaluar la biocompatibilidad de las NPs utilizadas mediante experimentos en jaula metabólica (Phenomaster).

Todos los experimentos que involucraron la inyección de NPs por vía intravenosa, intratumoral o subcutánea se realizaron con éstas dispersas en medios fisiológicos, concretamente, PBS (*phosphate buffered saline*) y TBS (*tris-buffered saline*) Todos los experimentos *in vivo* realizados a lo largo de la tesis se llevaron a cabo bajo las directrices de la normativa europea 2013/63/UE sobre manipulación de animales de laboratorio y fueron aprobados por el Comité de Ética de la INvestigación la Universidad Autónoma de Madrid (CEIT) en el marco de los siguientes proyectos financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad: FIS-PI12/01253, MAT2010-21270-C04-01 y MAT2013-47395-C4-1-R.

Asimismo, los procedimientos a los que fueron sometidos en el transcurso de la investigación fueron supervisados por los investigadores designados (Dr. Francisco Sanz, Dra. Nuria Fernández Monsalve y Dra. Elisa Carrasco Cerro, que cuentan con el certificado de categoría C para el manejo de animales para la experimentación científica), así como por el personal veterinario de las instalaciones. Para minimizar los efectos adversos sufridos por los animales durante los tratamientos, se utilizó anestesia (isoflurano) y analgesia. En cuanto a la aplicación del isoflurano inhalado, en todos los casos se realizará de la misma manera, se inducirá la sedación con un 5% de isoflurano en una cámara de metacrilato, para posteriormente mantener al animal dormido con un 2% de isoflurano durante el desarrollo del experimento.

Durante todos los experimentos, se aplicaron criterios de severidad para, una vez minimizar o eliminar las condiciones adversas (disminución de peso, edemas, dolor), sacrificando al animal de forma humanitaria o finalizando el estudio. Al término de los experimentos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical o por inhalación de CO₂.

Debido a la variedad de experimentos realizados, los procedimientos se describirán por separado en los siguientes apartados.

3.5.1. Bioimagen y biodistribución

Para los experimentos de bioimagen, se utilizaron los sistemas experimentales descritos en el apartado 3.2. El procedimiento seguido en cada uno de los experimentos, cuyos resultados se presentan en el capítulo 0, se describe a continuación. Estos experimentos se realizaron en el animalario de la facultad de medicina de la UAM.

3.5.1.1. Estudio de la autofluorescencia infrarroja

Para analizar la autofluorescencia *in vivo* y *ex vivo* en el infrarrojo bajo excitación con luz de 808 nm de longitud de onda utilizamos el montaje experimental para imagen infrarroja con filtrado espectral (ver **Figura 3.2**) al que se incorporó un sistema de anestesia mediante un flujo controlado de isoflurano con el objetivo de mantener a los animales anestesiados durante todo el procedimiento, como se muestra en la **Figura 3.4**. Para todos los experimentos, se utilizó un láser de diodo de 808 nm (LIMO) funcionando en modo continuo a una densidad de potencia de $0.2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Se analizó un total de 15 ratones, 3 de cada una de las siguientes cepas: C57BL/6J (pelaje negro), BJA/1LacJ (pelaje gris), C3H (pelaje agutí), CD1 (pelaje blanco) y SKH1 (sin pelo).

Después de realizar la primera toma de imágenes, los ratones fueron depilados y se repitió la toma de imágenes para evaluar el efecto de la presencia/ausencia de pelo. Para cada uno de los ratones, se tomaron imágenes con cada uno de los filtros dispuestos en la rueda de filtros (paso alto de 900, 1000, 1100, 1200, 1300 y 1400 nm).

Después de los experimentos de imagen *in vivo*, los ratones fueron sacrificados y diseccionados para analizar *ex vivo* la autofluorescencia de cada uno de sus órganos. Para obtener estas imágenes se utilizaron las mismas condiciones de excitación que en los experimentos de imagen *in vivo*.

3.5.1.2. Imagen *in vivo* mediante filtrado espectral: NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$

Los experimentos de imagen *in vivo* y *ex vivo* con estas NPs se realizaron sobre seis ratones hembra de 9 semanas de edad de la cepa CD1. Todos los animales recibieron, después de ser anestesiados, una inyección a través del seno retroorbital de 50 μL de una dispersión en PBS de NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$ a una concentración de $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. La obtención de imágenes *in vivo* se realizó en el mismo sistema descrito en el apartado

anterior (ver **Figura 3.4**), donde se mantuvo al ratón anestesiado en todo momento. El láser de diodo de 808 nm utilizado como fuente de excitación se mantuvo en modo continuo, proporcionando una densidad de potencia de $0.5 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ en todos los experimentos.

Para obtener el patrón de biodistribución de las NPs en función del tiempo, cinco de los ratones fueron sacrificados a distintos tiempos (1, 4, 24, 48 y 72 h) después de la inyección y se realizó el análisis *ex vivo* de la fluorescencia de los distintos órganos utilizando el mismo sistema experimental.

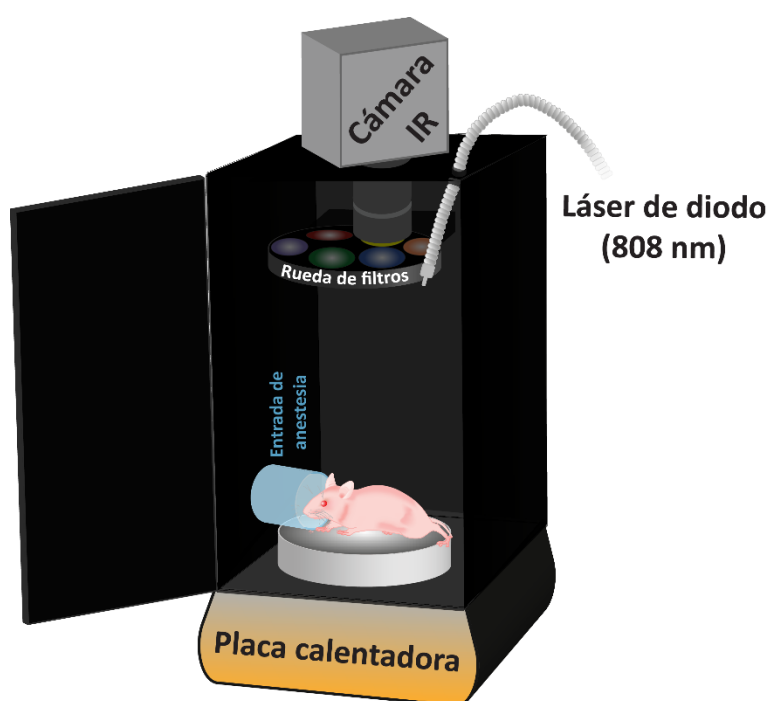


Figura 3.4. Sistema de imagen infrarroja *in vivo*. A la caja de metacrilato del sistema de imagen infrarroja se le añadió un orificio circular en uno de los laterales, a través del cual se incorporó un tubo de plástico conectado al flujo de isoflurano para poder mantener anestesiados a los ratones dentro del sistema de imagen.

3.5.1.3. *Imagen in vivo mediante filtrado espectral: QDs de PbS/CdS/ZnS*

Estos experimentos se realizaron sobre tres ratones CD1, que fueron inyectados por vía intravenosa con 100 μL de una dispersión de QDs concentrada a $0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS. Previamente a la inoculación, que se realizó por vía retroorbital, los ratones fueron anestesiados y afeitados. Inmediatamente después de la inyección, los ratones fueron trasladados al sistema de imagen *in vivo* mostrado en la **Figura 3.4**, donde se les mantuvo anestesiados durante todo el experimento. Para la toma de imágenes, el láser de diodo de 808 nm se utilizó en modo continuo a una densidad de potencia de $0.1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Para estudiar el patrón de biodistribución de los QDs, los tres ratones fueron sacrificados a distintos tiempos después de la inoculación de las NPs (50 segundos, 48 horas y 25 días). Posteriormente, los ratones fueron diseccionados para estudiar la fluorescencia de los distintos órganos por separado utilizando las mismas condiciones experimentales que para la obtención de imágenes *in vivo*.

3.5.1.4. *Imagen in vivo mediante filtrado temporal*

Para los experimentos de bioimagen infrarroja mediante filtrado temporal, cuyos resultados se describen en la sección 97, se utilizaron tres ratones C57BL/6. Uno de los ratones fue utilizado como control, otro fue inyectado subcutáneamente con una dispersión acuosa de NPs (100 μL a una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y el restante recibió las NPs (200 μL de una dispersión acuosa a $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) por vía oral a través de una cánula metálica con punta de oliva.

En este caso, se operó con el láser de diodo de 808 nm utilizado como fuente de excitación en modo pulsado (duración del pulso: 1 ms; periodo: 40 ms). El tiempo de retardo entre el final del pulso láser y la adquisición de la imagen infrarroja se varió en el rango 1 – 200 μs . El sistema experimental utilizado es el mostrado en la **Figura 3.3 (a)**, al que se incorporó el sistema de anestesia que habíamos utilizado en el caso del filtrado espectral (**Figura 3.4**).

3.5.2. Experimentos en jaula metabólica (Phenomaster)

Los experimentos *in vivo* en jaula metabólica, encaminados a medir los posibles efectos adversos de las NPs sobre diferentes procesos fisiológicos y metabólicos en los ratones, se llevaron a cabo en el Gabinete Veterinario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM). Para estos experimentos, se utilizó un total de 16 ratones hembra CD1 (Harlan), que fueron mantenidos durante cinco días en jaulas individuales TSE Phenomaster (TSE systems). Estas jaulas permiten medir, en intervalos de 60 minutos, distintos parámetros relacionados con la actividad física y metabólica de los ratones, incluyendo:

- Cantidad de comida y bebida ingerida por los ratones
- Movimiento de los ratones en el centro y en la periferia de la jaula, que se mide a partir de cortes en haces de luz en el plano del suelo de la jaula. A partir de estos datos, el sistema determina automáticamente la distancia total recorrida por los ratones. Los movimientos realizados en el eje vertical no son medibles con el sistema experimental disponible.
- Temperatura.
- Volumen de CO₂ espirado y volumen de O₂ consumido. El cociente de ambas permite determinar la tasa de intercambio respiratorio (RER por sus siglas en inglés, *Respiratory Exchange Rate*).
- Producción de calor (en W/kg)

De los 5 días de duración de los experimentos, el primero se utilizó para la aclimatación de los ratones a las jaulas metabólicas. El segundo día, los ratones fueron inoculados con alguna de las NPs estudiadas (NaGdF₄:Nd³⁺ de 500 nm de diámetro, NaGdF₄:Nd³⁺ de 20 nm de diámetro o QDs de PbS/CdS/ZnS) por vía intravenosa o por vía oral, siguiendo el esquema detallado en la **Tabla 3.1**. Las inoculaciones por vía oral se realizaron sobre ratones sin anestésiar utilizando una cánula metálica con punta de oliva. En el caso de la administración intravenosa, los ratones fueron inyectados por vía retroorbital después de ser anestesiados. Después de la administración de las NPs, los ratones fueron devueltos a sus respectivas jaulas para llevar a cabo el estudio de su actividad física y metabólica durante 4 días completos.

NP	Vía de administración	Dosis inoculada	Número de ratones
NaGdF ₄ :Nd ³⁺ (500 nm)	Oral	200 μ L (10 mg·mL ⁻¹ en agua)	3
	Intravenosa	100 μ L (1 mg·mL ⁻¹ en PBS)	1
NaGdF ₄ :Nd ³⁺ (20 nm)	Oral	200 μ L (10 mg·mL ⁻¹ en agua)	3
	Intravenosa	100 μ L (1 mg·mL ⁻¹ en PBS)	1
QDs de PbS/CdS/ZnS	Oral	200 μ L (0.1 mg·mL ⁻¹ en agua)	3
	Intravenosa	100 μ L (0.05 mg·mL ⁻¹ en PBS)	3
Control	Oral	200 μ L de agua	1
	Intravenosa	100 μ L de PBS	1

Tabla 3.1. Distribución de los ratones para los experimentos en jaula metabólica.

3.5.3. Terapia fototérmica

Todos los experimentos de terapia fototérmica se llevaron a cabo en el Gabinete Veterinario Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM) con la colaboración de la Prof. Ángeles Juarranz y la Dra. Elisa Carrasco, que llevaron a cabo la inducción de los tumores en los ratones y el manejo de éstos durante todos los experimentos. Durante la duración del experimento, los ratones fueron estabulados en un ambiente estéril con acceso a comida y agua en todo momento.

3.5.3.1. Terapia fototérmica mediante NPs de LaF₃:Nd³⁺

Para el modelo de inducción de tumores, se utilizaron 6 ratones hembra atímicos (inmunodeprimidos) de 9 a 16 semanas de edad y 28-32 g de peso al inicio de los experimentos (Harlan). La inducción de los tumores se llevó a cabo mediante la inoculación subcutánea, en ambos flancos, de 10⁷ células MDA-MB-231 (línea celular de adenocarcinoma mamario humano) resuspendidas en 200 μ L de PBS. Cuando el volumen de los tumores alcanzó los 9 mm³, se llevaron a cabo los experimentos de terapia fototérmica con control de temperatura. La distribución de los tumores para los tratamientos y los distintos casos control se muestra en la **Tabla 3.2**.

Antes del tratamiento, los ratones fueron anestesiados e inyectados por vía intratumoral con las NPs de LaF₃:Nd³⁺ (100 mg·mL⁻¹ en PBS) por vía intratumoral. El volumen de la inyección se ajustó en cada caso para ser aproximadamente igual a la mitad del volumen del tumor a tratar. Los tumores fueron a continuación irradiados

durante 4 minutos con un láser de 808 nm de longitud de onda (LIMO) a una densidad de potencia de $4 \text{ W}\cdot\text{cm}^2$. Durante el proceso de iluminación se registró en tiempo real y de forma simultánea la temperatura superficial a través de termografía infrarroja y la fluorescencia de las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$. Con este propósito, se colocó, a 1 cm de la superficie del tumor, una fibra óptica de baja apertura numérica (0.22) conectada a un espectrómetro acoplado a una CCD (ver sección 3.1.2) que permitía registrar la emisión de las NPs de manera continua. Utilizando un algoritmo interno del *software* de medida, era posible calcular en tiempo real la relación entre las dos bandas de emisión de las NPs y de esta forma determinar la temperatura intratumoral. El tumor utilizado como control láser + PBS recibió una irradiación en las mismas condiciones después de una inyección de PBS sin NPs en un volumen equivalente a la mitad del tumor.

3.5.3.2. *Terapia fototérmica mediante NPs de NdVO_4*

En este caso, antes de la realización de la terapia fototérmica, se estudió el calentamiento in vivo de las NPs de NdVO_4 con el objetivo de determinar con mayor certeza las densidades de potencia adecuadas para la terapia fototérmica. Para este experimento, se utilizó un ratón hembra CD1 de 6 semanas de edad. Después de ser anestesiado, el ratón fue inyectado por vía subcutánea con 100 μL de una dispersión de NPs de NdVO_4 en TBS. A continuación, manteniendo al ratón anestesiado con isoflurano al 2 %, se procedió a la irradiación del área inyectada con un láser de diodo de 808 nm (LIMO) a $0.8 \text{ W}\cdot\text{cm}^2$. Durante el proceso, se evaluó de manera continua la temperatura superficial del lugar inyectado mediante termografía infrarroja.

Para el modelo xenográfico de tumor se emplearon 5 ratones hembra atímicos (Envigo), de 8 semanas de edad en el momento del comienzo de los experimentos. La inducción de los tumores se realizó en este caso inyectando $3\cdot 10^6$ células A431 (línea celular de carcinoma epidermoide humano) en cada uno de los flancos de los ratones. Cuando el volumen de los tumores alcanzó los 100 mm^3 , se realizaron los experimentos de terapia fototérmica con la distribución de los casos indicada en la **Tabla 3.2**. Durante el tratamiento, los ratones se mantuvieron anestesiados mediante inhalación de isoflurano. Los tumores a tratar fueron inyectados con un volumen equivalente a la

mitad del volumen tumoral con una dispersión de NPs en TBS ($100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). A continuación, fueron irradiados durante 4 minutos con un láser de diodo de 808 nm (área del spot: 2 cm^2) a densidades de potencia entre 0.6 y $0.8 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Los ratones de control láser + TBS fueron irradiados en las mismas condiciones tras una inyección intratumoral de TBS. Después del tratamiento, la evolución de los tumores fue monitorizada durante doce días.

3.5.3.3. *Terapia fototérmica mediante QDs de PbS/CdS/ZnS*

Para el modelo xenográfico de tumor, se emplearon en este caso 7 ratones hembra atímicos desnudos (Envigo) de 8 semanas de edad. La inducción de los tumores se realizó en este caso, al igual que en el estudio relativo a las NPs de NdVO_4 , inyectando $3\cdot 10^6$ células A431, resuspendidas en PBS, en cada uno de los flancos de los ratones. Cuando el tamaño de los tumores alcanzó los 100 mm^3 , se realizaron los experimentos de terapia fototérmica con la distribución de los casos indicada en la **Tabla 3.2**.

Antes de la terapia, los ratones previamente anestesiados fueron inyectados en los tumores a tratar $60 \text{ }\mu\text{L}$ (un volumen aproximadamente equivalente a la mitad del volumen tumoral) de una dispersión de QDs en PBS ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Después de la inyección, los ratones fueron trasladados al sistema de imagen infrarroja (ver Figura 2.3), donde se les mantuvo anestesiados durante todo el proceso. Los tumores tratados fueron irradiados durante 4 minutos con un láser de diodo de 808 nm, cuyo *spot* fue ajustado a un área de 2 cm^2 , a las siguientes densidades de potencia: 0.65 , 1 , 1.3 , 1.7 , 2 y $2.3 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$). Durante todo el tratamiento, la temperatura superficial del animal se monitorizó mediante termografía infrarroja, al tiempo que se registraba la emisión de los QDs en tiempo real a través de la cámara de InGaAs incorporada al sistema (ver **Figura 3.4**) utilizando un filtro de paso alto de 1200 nm (Thorlabs FEL1200). Los tumores control láser + PBS recibieron una irradiación en las mismas condiciones después de ser inyectados por vía intratumoral con PBS sin QDs. Después del tratamiento, se monitorizó la evolución de los tumores durante 22 días, salvo en los casos donde el excesivo crecimiento tumoral obligó al sacrificio inmediato de los ratones por motivos éticos.

NP	Vía de administración	Línea celular	Concentración de NPs inoculada (mg·mL ⁻¹)	Densidad de potencia (W·cm ⁻²)	Tiempo de tratamiento (min)	Nº de ratones		
						Nº total	Distribución de los casos	Tumores para casos control
LaF ₃ :Nd ³⁺	Intratumoral	MDA-MB-231	100	4	4	6	3 ratones para PTT en ambos tumores	
							3 ratones para PTT en un tumor y control en el otro	1 control PBS + láser
								1 control NPs sin láser
								1 control total
NdVO ₄	Intratumoral	A431	100	0.6-0.8	4	5	PTT en un tumor (3 a 0.8 W·cm ⁻² y 2 a 0.6 W·cm ⁻² y control en el otro en los 5 ratones	2 controles TBS + láser (1 a 0.8 W·cm ⁻² y 2 a 0.6 W·cm ⁻²)
								2 controles NPs sin láser
								1 control total
QDs de PbS/CdS/ZnS	Intratumoral	A431	5	0.65-2.3	4	7	3 ratones para PTT en ambos tumores	
							4 ratones para casos control	5 controles PBS + láser (1 a 0.65-2.3 W·cm ⁻²)
								2 controles QDs sin láser
								1 control total

Tabla 3.2. Parámetros más relevantes de los experimentos in vivo de terapia fototérmica llevados a cabo en el desarrollo de esta tesis. En todos los casos, se utilizó como fuente de excitación de las NPs calentadoras un láser de diodo de 808 nm (LIMO). El volumen de dispersión de NPs inyectado fue, en todos los casos, aproximadamente igual a la mitad del volumen del tumor tratado

3.6. Síntesis de NPs

En esta sección se describirán brevemente los procedimientos seguidos para sintetizar las NPs estudiadas a lo largo de esta tesis doctoral, cuyas propiedades principales (composición, recubrimiento superficial, tamaño, diámetro hidrodinámico y zeta potencial) se indican en la **Tabla 3.3**. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) a partir de las cuales se determinó el tamaño, se muestran en la **Figura 3.5**. No obstante, la síntesis y caracterización básica de las propiedades fisicoquímicas de las NPs fue llevada a cabo por diferentes grupos con los que se estableció una colaboración en el marco de esta tesis (ver **Tabla 3.3**), la cual tiene por objetivo no la fabricación sino el estudio de distintos sistemas para aplicaciones de bioimagen y terapia térmica.

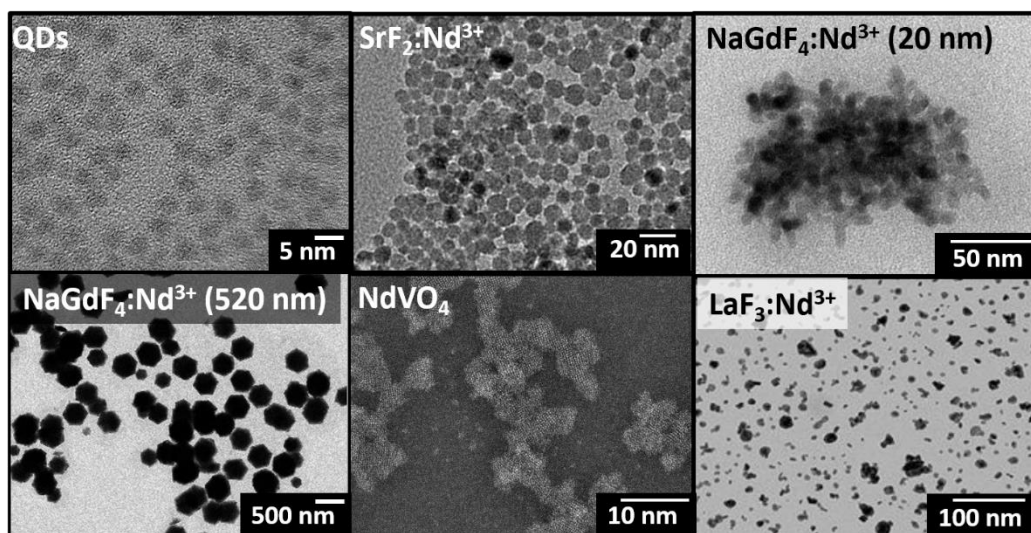


Figura 3.5. Imágenes de TEM de las NPs utilizadas en esta tesis doctoral, proporcionadas en cada uno de los casos por los grupos encargados de la síntesis de las NPs.

NP	% de ión dopante (mol %)	Recubrimiento superficial	Tamaño promedio (nm)		Zeta potencial (mV)	Procedencia
			TEM	Diámetro hidrodinámico		
QDs de PbS/CdS/ZnS	-	MPA	5.6 ± 0.4	26 ± 3	-24.2	INRS
SrF ₂ :Nd ³⁺	3	-	10 ± 4	--	-24.9	U. di Verona
NaGdF ₄ :Nd ³⁺	5	PNIPAM	520 ± 50	530 ± 5	-	UAM
			20 ± 4			
LaF ₃ :Nd ³⁺	1-25	-	12 ± 3		-	UFAL
NdVO ₄	-	-	2.4 ± 0.6	5.7 ± 0.7	-38.5	U. Belgrado

Tabla 3.3. Características principales y procedencia de las NPs utilizadas a lo largo de esta tesis. Se incluyen los tamaños obtenidos a través de las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM), diámetros hidrodinámicos (medidos a través de DLS – *Dynamic Light Scattering* o Dispersión Dinámica de Luz, recubrimientos superficiales en el caso de presentarlos y carga superficial (zeta potencial). Además, para las NPs dopadas con iones Nd³⁺, se muestra el porcentaje molar de dopaje. Se indica, además, el centro al que pertenecen los grupos que sintetizaron las NPs.

3.6.1. Síntesis de QDs de PbS/CdS/ZnS

Los QDs de PbS/CdS/ZnS utilizados en esta tesis fueron sintetizados por el Dr. F. Ren, del grupo de la Prof. D. Ma en el Centre Énergie Matériaux Télécommunications del Institut National de la Recherche Scientifique (INRS) en Québec (Canadá).

Para fabricarlos, se utilizaron los siguientes precursores comerciales: cloruro de plomo (98%), azufre (100%), oleilamina (OLA) (grado técnico, 70%), óxido de cadmio (99%), metanol (anhidro, 99.8%), octadeceno (ODE), ácido mercaptopropiónico (MPA) ($\geq 99.0\%$), 1-metil-2-pirrolidona (NMP) ($\geq 99\%$), butilamina (99.5%), pentasulfuro de fósforo (99%) y cloruro de cinc (99.999%), obtenidos a través de Sigma-Aldrich Inc. Hexano, PBS (buffer fosfato salino, de pH 7.4), ácido oleico, tolueno y etanol fueron comprados en Fisher Scientific Company.

El *core* de los QDs, de PbS, se sintetizó utilizando OLA como recubrimiento superficial. En primer lugar, una mezcla 10 g de cloruro de plomo (PbCl_2) y 24 mL se calentó hasta 160 °C utilizando un baño de aceite, manteniéndose a esta temperatura durante 1 hora en atmósfera de nitrógeno. A continuación, la solución se dejó enfriar hasta alcanzar los 120 °C y se sometió a vacío durante 30 minutos para eliminar los restos de agua y solventes orgánicos. Sobre esta mezcla PbCl_2 -OLA, se inyectó rápidamente la dispersión de 115 mg de azufre en 4 mL de OLA a temperatura ambiente agitando vigorosamente. Después de mantener la celda de reacción a 100 °C durante 10 minutos para obtener los QDs de PbS, se procedió al enfriamiento de ésta utilizando agua fría.

Sobre el *core* de PbS obtenido de la reacción anterior, se añadió un shell de CdS siguiendo el método reportado por Ren *et al.* [Ren 2013] Para comenzar la síntesis, se calentó una mezcla de 3 g de óxido de cadmio, 15 mL de OA y 20 mL de ODE utilizando un baño de aceite hasta que la dispersión pasó a ser incolora (200-250 °C). En ese momento, se enfrió la dispersión hasta 100 °C y se desgasificó en vacío durante 30 minutos. La temperatura se redujo de nuevo hasta 20 °C, para inyectar a continuación 12 mL de la dispersión de QDs de PbS. Finalmente, 20 mL de esta mezcla se

introdujeron en un tubo de reacción de 35 mL y se hicieron reaccionar en un reactor de microondas (Discover; CEM Corporation) a 100 °C durante 3 minutos.

Finalmente, para añadir el *shell* de ZnS, junto con el recubrimiento superficial de MPA, se siguió el método reportado por Benayas *et al.* en 2015.[Benayas 2015] En una reacción típica, se mezclaron 0.045 mmol de pentasulfuro de fósforo, 0.4 mL de MPA y 0.3 mL de butilamina en 10 mL de NMP y se calentaron a 110 °C durante 20 minutos en un vial sellado para disolver el azufre. En un vial separado, 0.51 mmol de cloruro de cinc, 0.4 mL de MPA y 0.3 mL de butilamina se mezclaron con 10 mL de NMP y se calentaron de la misma manera para disolver el cloruro de cinc. Después de dejar enfriar hasta temperatura ambiente, 0.007 g de los QDs *core/shell* de OLA-PbS/CdS obtenidos anteriormente se dispersaron en la solución de pentasulfuro de fósforo; y a continuación se mezclaron con la solución de cloruro de cinc. Esta mezcla se calentó a 70 °C durante 30 minutos, dando como producto final los QDs *core/shell/shell* de PbS/CdS/ZnS con un recubrimiento superficial de MPA.

3.6.2. Síntesis de NPs dopadas con iones Nd^{3+}

En este apartado, se describirán brevemente la síntesis de los nanocristales dopados con iones Nd^{3+} utilizados a lo largo de esta tesis: $\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$, $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$, $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ y NdVO_4 .

3.6.2.1. Síntesis de NPs de $\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$

La síntesis de estas NPs fue llevada a cabo por M. Pedroni, del grupo del Prof. A. Speghini, en el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Verona (Italia) siguiendo el método de síntesis hidrotermal descrito por estos mismos autores.[Pedroni 2013]

En un vaso de precipitados de teflon, se disolvieron cantidades estequiométricas de cloruros de estroncio y neodimio, $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba, >99%) y $\text{NdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich, 99.9%), en 7 mL de agua desionizada. A continuación, se añadieron gota a gota 20 mL de una solución de concentración 1 M de citrato de potasio agitando vigorosamente. A esta solución se añadieron 8.75 mmol de fluoruro de amonio (NH_4F , Baker, 99%). La solución transparente resultante se introdujo en un autoclave (DAB-2,

Berghof) con cámara de Teflon, donde se trató a 190 °C durante 6 horas. A continuación, se dejó enfriar el autoclave hasta temperatura ambiente, y se centrifugó (a 7000 rpm durante 20 minutos) la solución resultante para obtener las NPs, que tras ser lavadas en una solución 2:1 de agua desionizada y acetona son fácilmente dispersables en agua y en medio fisiológico (PBS).

3.6.2.2. Síntesis de NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$

Las NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$ fueron sintetizadas por la Dra. E. Martín Rodríguez en el Departamento de Física de Materiales de la Universidad Autónoma de Madrid, adaptando un método de descomposición térmica descrito en la literatura.[Naccache 2009]

Como primer paso, se prepararon trifluoroacetatos de gadolinio y neodimio haciendo reaccionar Nd_2O_3 (0.125 mmol, 5 mol%) y Gd_2O_3 (2.38 mmol, 1 equivalente) con una mezcla de agua destilada (5 mL) y ácido trifluoroacético (5 mL). La solución turbia obtenida fue tratada a 80 °C mediante reflujo hasta volverse transparente; y posteriormente fue secada a 60 °C. A continuación, se añadió trifluoroacetato sódico (2.50 mmol, 0.340 g) a los precursores sólidos, junto con ácido oleico (20 mL) y 1-octadeceno (20 mL). La solución fue desgasificada en vacío a 120 °C durante 30 minutos para posteriormente incrementar rápidamente (en menos de 15 minutos) la temperatura hasta 320 °C bajo flujo de argón. Una vez alcanzada la temperatura deseada, la dispersión se dejó reaccionar durante 2 horas, después de las cuales se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Las NPs fueron precipitadas utilizando etanol, aisladas mediante centrifugación y lavadas dos veces con una mezcla 1:6 de hexano y etanol.

Las NPs obtenidas de esta manera, cubiertas de oleato, fueron suspendidas en n-hexano (5 mL) y agua (5 mL). A esta mezcla se añadió 1 mL de ácido acrílico; y se mantuvo en agitación constante durante 16 horas para lograr un cambio de ligandos. A continuación, la muestra fue centrifugada (6000 rpm, 30 minutos) y se retiró el sobrenadante. Las NPs obtenidas fueron almacenadas durante 3 meses para producir un crecimiento cristalino lento y homogéneo.

Finalmente, las NPs cubiertas por ácido acrílico (28 mg en total) se dispersaron en agua desionizada (35 mL) mediante agitación vigorosa, al tiempo que se añadieron *N*-isopropilacrilamida (100 mg), acrilamida (13 mg), bisacrilamida (13 mg), y alilamina (24.4 μ L). A continuación, se añadieron 41 mg de dodecilsulfato sódico y persulfato de amonio, mientras que se desoxigenó la dispersión utilizando un flujo continuo de Ar al tiempo que se sonicaba la muestra durante 5 minutos. La polimerización se inició añadiendo a ésta 100 μ L de *N,N,N,N*-tetrametiletilenediamina, tras lo cual la muestra fue agitada durante 4 horas y posteriormente centrifugada (6000 rpm, 30 minutos). Las NPs resultantes se lavaron tres veces con 5 mL de agua desionizada y posteriormente se secaron en presencia de CaCl_2 . La existencia de un recubrimiento de PNIPAM (Poly(*N*-isopropilacrilamida)) fue evidenciada mediante espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

3.6.2.3. Síntesis de NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$

Las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$ fueron sintetizadas por el Dr. K. U. Kumar, del Instituto de Física de la Universidad Federal de Alagoas (UFAL) en Maceió (Brasil) utilizando el método solvotermal reportado por Wang *et al.* [Wang 2006]

Los precursores, tricloruro de lantano (LaCl_3 , 99.9%), tricloruro de neodimio (NdCl_3 , 99.9%) y fluoruro de amonio (NH_4F , 99.9%), fueron comprados en Sigma-Aldrich y utilizados directamente. En una síntesis típica, $(1 - x)$ mmol de LaCl_3 y x mmol de NdCl_3 (donde x determina el % molar de dopaje: para las NPs utilizadas en esta tesis doctoral $x = 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20$ y 25 %) se añadieron a 80 mL de agua desionizada en un matraz esférico. La mezcla fue calentada a 75 °C y mantenida a esta temperatura bajo agitación constante durante 15 minutos. A continuación, 3 mmol de NH_4F diluidos en 3 mL de agua desionizada se añadieron gota a gota a la solución anterior. La mezcla se mantuvo a 75 °C y presión ambiente durante 3 horas, agitándose continuamente durante este tiempo, de forma que gradualmente se fue formando una suspensión de color blanco. Las NPs resultantes se recogieron después de centrifugar esta suspensión a 8000 rpm durante 7 minutos. El precipitado fue lavado repetidamente con agua

desionizada y centrifugado por última vez a 12000 rpm durante 12 minutos, después de lo cual fue secado a 60 °C y presión ambiente durante 24 horas.

3.6.2.4. Síntesis de NPs de NdVO₄

Las NPs de NdVO₄ utilizadas en esta tesis doctoral fueron sintetizadas por la Dra. D. Jovanović en el Instituto Vinča de Ciencias Nucleares de la Universidad de Belgrado (Serbia) utilizando un método coloidal.

Para la síntesis, se utilizaron los siguientes precursores comerciales: nitrato de neodimio hexahidratado, Nd(NO₃)₃·6H₂O (99.9%, Alfa Aesar); óxido de amonio y vanadio, NH₄VO₃ (mín. 99.0%, Alfa Aesar); citrato trisódico (99+%, Sigma Aldrich) e hidróxido sódico, NaOH (mín. 99.0%, Moss Hemos).

Las dispersiones coloidales de NdVO₄ se sintetizaron de la siguiente manera: 15 mL de una solución 0.05 M de citrato trisódico se añadió gota a gota a 20 mL de una dispersión 0.05 M de Nd(NO₃)₃ a temperatura ambiente. Esto dio lugar a la formación de un precipitado blanco debido a la formación del complejo Nd³⁺-citrato³⁻, que fue sometido a agitación durante 30 minutos. A continuación, se añadieron gota a gota 15 mL de una solución 0.05 M de NH₄VO₃ (disuelto en NaOH 0.15 M). Esto resultó en la desaparición del precipitado, dando lugar a una solución transparente de color azulado y de pH ≈ 8, que se sometió a un proceso de agitación y calentamiento a 60 °C durante 60 minutos. Finalmente, se dejó enfriar la dispersión coloidal a temperatura ambiente, alcanzándose un lento crecimiento de las partículas a través de diálisis contra agua desionizada hasta conseguir un pH = 7. Para obtener una dispersión de estas NPs en medio fisiológico, se procedió a la evaporación del agua y posterior redispersión del precipitado obtenido en TBS. La elección de este *buffer* como medio fisiológico, en lugar del PBS utilizado en el resto de los casos, vino motivada por el efecto del PBS sobre las NPs, que resultaba en su agregación y parcial precipitación.

4. Imagen *in vivo* en el infrarrojo

4.1. Autofluorescencia en las ventanas biológicas

Como se explicó en la introducción, para obtener imágenes *in vivo* de fluorescencia en profundidad es necesario recurrir a marcadores fluorescentes que operen en el infrarrojo debido a la baja penetración de la luz visible en los tejidos. Por ello, en el desarrollo de esta tesis nos centramos en el estudio de NPs que presentan bandas de excitación y emisión en las ventanas biológicas. No obstante, a la hora de aplicar este tipo de NPs en distintos experimentos de bioimagen *in vivo* debimos enfrentarnos a un problema que no había sido estudiado en detalle con anterioridad: la presencia de autofluorescencia en el infrarrojo cercano.

En el montaje experimental básico utilizado para todos los experimentos de bioimagen llevados a cabo durante el desarrollo de esta tesis (ver **Figura 3.1**), la señal de fondo correspondiente a la radiación láser de excitación (808 nm) se eliminaba utilizando un filtro de paso alto de 850 nm. De esta forma, teniendo en cuenta la curva de sensibilidad de la cámara infrarroja utilizada, mostrada en la **Figura 3.1 (b)**, obteníamos imágenes de fluorescencia integrando toda la señal de emisión en el rango 850-1700 nm. Esta aproximación resultó no ser suficientemente buena para realizar experimentos de bioimagen *in vivo* debido a la presencia de una señal de fondo que variaba enormemente de un animal a otro y nos impedía aislar adecuadamente la emisión procedente de las NPs. Por tanto, era necesario determinar la causa de esta señal de fondo y estudiar sus propiedades espectroscópicas para diseñar estrategias que nos permitiesen eliminarlo, de forma que pudiéramos obtener imágenes de alto contraste.

Parte del fondo observado en las imágenes se pudo atribuir inmediatamente a la autofluorescencia de ciertos componentes presentes en la alimentación de los animales de laboratorio. En la **Figura 4.1 (a)** se muestra la imagen de fluorescencia infrarroja bajo excitación con 808 nm de un *pellet* utilizado para la alimentación de los ratones en el rango 900-1700 nm, donde se aprecia una intensa emisión que se va haciendo más débil para longitudes de onda más largas. Esta característica concuerda con el espectro

de emisión en el infrarrojo (850 – 1400 nm) obtenido para esta muestra bajo excitación con 808 nm, que se muestra en la **Figura 4.1 (b)**.

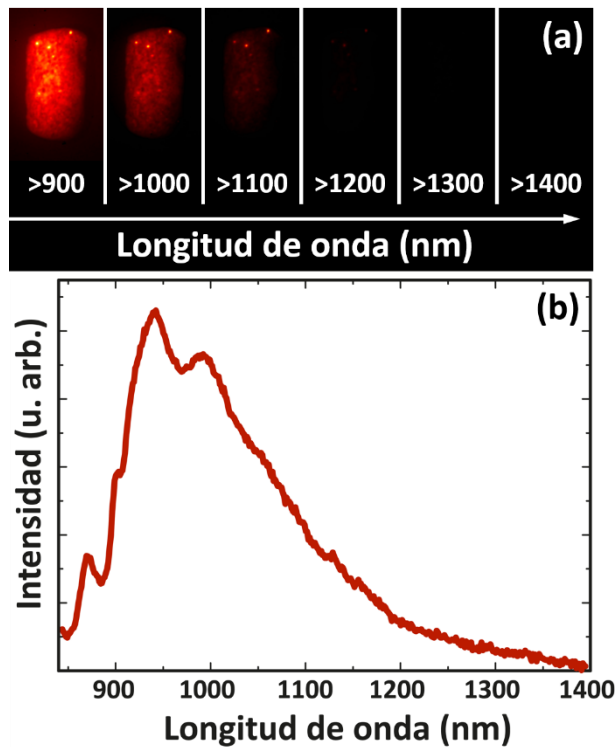


Figura 4.1. Autofluorescencia en el infrarrojo asociada a la dieta. (a) Imágenes infrarrojas obtenidas para un *pellet* etiquetado como “libre de fluorescencia” destinado a la alimentación de ratones de laboratorio. En cada caso, el rango de detección se ha delimitado mediante filtros de paso alto entre la longitud de onda indicada y 1700 nm. **(b)** Espectro de emisión en el infrarrojo obtenido para la muestra de comida cuyas imágenes se muestran en (a). En ambos casos, se utilizó un láser de 808 nm como fuente de excitación.

Esta fluorescencia presente en la comida había sido observada anteriormente, aunque únicamente para longitudes de onda inferiores a 900 nm, y atribuida por parte de los autores a determinados compuestos de la alfalfa presentes en la dieta de los animales de laboratorio.[Troy 2004, Inoue 2008] En particular, las clorofilas, que presentan una banda de emisión en el rango 850-1120 nm, pueden ser consideradas las responsables principales de la fluorescencia observada en la comida de los ratones. En el trabajo de Inoue *et al.*, se observó que una eliminación total de la clorofila en la dieta resultaba en imágenes libres de autofluorescencia asociada a la comida en el

rango 775-825 nm. Sin embargo, las distintas variedades de pienso de ratones que evaluamos en este trabajo, incluso aquellas que se etiquetaban como “libres de fluorescencia” seguían presentando una emisión en el infrarrojo en absoluto despreciable.

No obstante, las clorofilas presentes en la dieta de los animales no eran la causa única de la autofluorescencia infrarroja, sino que la pigmentación de los animales también contribuía de forma significativa a ésta. De hecho, la fluorescencia de la melanina en el infrarrojo (hasta 900 nm) bajo excitación con luz de 785 nm se ha planteado como una herramienta diagnóstica para lesiones cutáneas pigmentadas. [Huang 2006, Han 2009] No obstante, la relación entre la pigmentación y la autofluorescencia no había sido evaluada para longitudes de onda más largas de 900 nm antes del desarrollo de esta tesis doctoral. Para evaluar en profundidad la relación de la autofluorescencia en el infrarrojo con la pigmentación cutánea de los ratones, analizamos sistemáticamente la dependencia espectral de la autofluorescencia de distintas cepas de ratones a través de imágenes *in vivo*, bajo iluminación con un láser de 808 nm. Como se describe en detalle en la sección 3.5.1.1, se estudió la autofluorescencia para las pigmentaciones habituales de los ratones utilizados para experimentación (negro, pardo, agutí y blanco), incluyéndose también en el estudio una cepa de ratones desnudos inmunocompetentes. Para evitar, en la medida de lo posible, la contribución de la fluorescencia de la comida, los ratones fueron mantenidos en ayunas al menos 24 horas antes de la realización de los experimentos. Para acotar el rango de detección en estos experimentos se utilizaron distintos filtros de paso alto, que se introdujeron en el montaje utilizando una rueda de filtros motorizada, como se muestra en la **Figura 3.2**.

En la **Figura 4.2** se muestran los resultados principales de este experimento, que incluyen las imágenes obtenidas para dos rangos de detección: 900-1700 nm y 1200-1700 nm, respectivamente (**Figura 4.2 (a)**). A partir de estas imágenes podemos observar claramente que la autofluorescencia era mayor para los ratones de pigmentación más oscura. Esto queda patente en la **Figura 4.2 (b)**, donde se muestran las intensidades de emisión totales en todos los rangos espectrales medidos. La gráfica

superior de esta figura muestra los datos obtenidos para los ratones sin afeitar, mientras que la gráfica inferior corresponde a la intensidad medida para los ratones con el pelaje afeitado. Este afeitado es habitual a la hora de realizar imagen por fluorescencia en modelos animales para evitar la absorción y el *scattering* por parte del pelo de las señales de excitación y emisión. Podemos ver, sin embargo, que la señal de autofluorescencia es prácticamente idéntica en ambos casos, mientras que la observada en el caso de los ratones desnudos (cuyos datos se muestran en ambas gráficas para facilitar la comparación) es mucho menos intensa, alrededor de dos órdenes de magnitud inferior que la observada en el resto de cepas en el rango 900-1700 nm.

A partir de estos resultados, pudimos establecer una relación clara entre la autofluorescencia de los ratones y los pigmentos cutáneos, lo que está de acuerdo con trabajos previos en los que se estudiaba la autofluorescencia de la melanina en el infrarrojo bajo excitación con luz de 808 nm. La autofluorescencia relacionada con la melanina podría evitarse utilizando exclusivamente ratones desnudos para los estudios de imagen *in vivo* en el infrarrojo. Sin embargo, utilizar este tipo de ratones para todos los experimentos de bioimagen no era una opción viable en el marco de esta tesis debido a que su coste es notablemente elevado en comparación con el de las demás cepas de ratones habitualmente utilizadas para experimentos *in vivo*. Además, desde el punto de vista de la aplicabilidad de NPs fluorescentes en el infrarrojo para bioimagen, no resulta interesante limitar los resultados obtenidos a modelos animales sin pigmentación cutánea. Por el contrario, resulta imprescindible desarrollar un sistema universal que permita obtener imágenes libres de autofluorescencia independientemente de la pigmentación cutánea del individuo, lo cual requiere el desarrollo de técnicas de imagen con este objetivo.

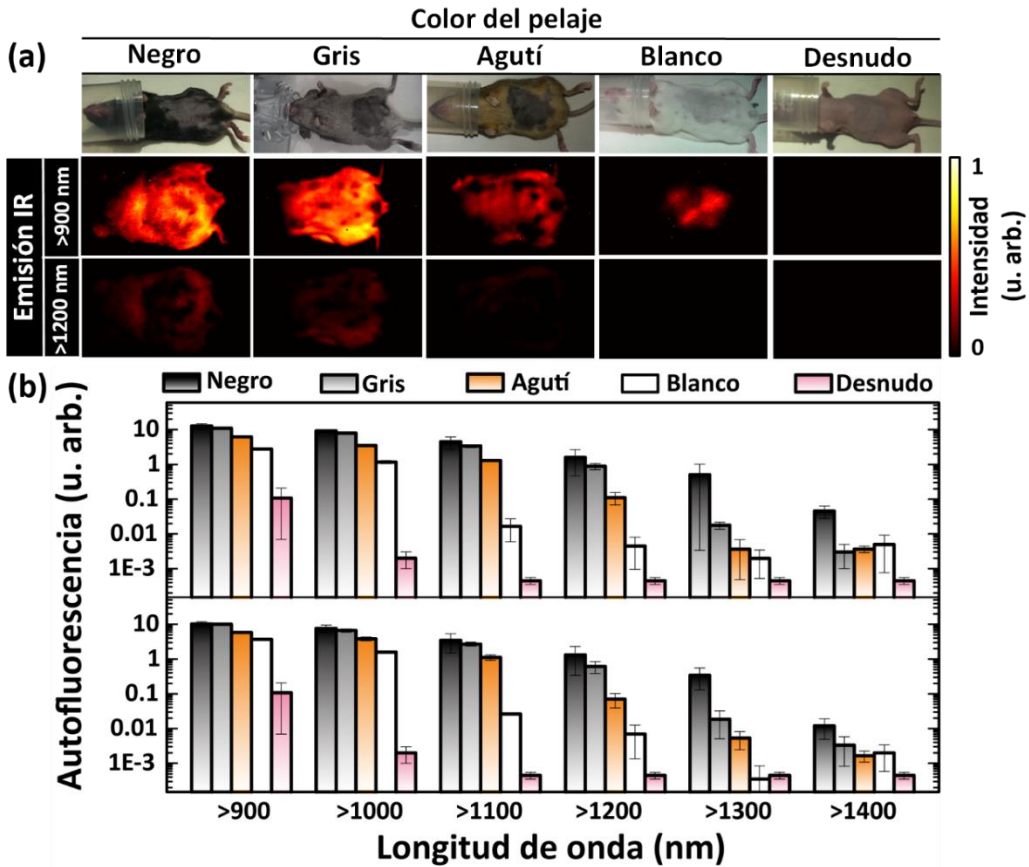


Figura 4.2. Autofluorescencia infrarroja *in vivo*. (a) Imágenes ópticas y de fluorescencia infrarroja obtenidas en los rangos 900-1700 nm y 1200-1700 nm para un ratón de cada una de las cepas estudiadas. Como se muestra en las imágenes ópticas, los ratones fueron parcialmente afeitados antes de la toma de imágenes. (b) Intensidad de fluorescencia en el infrarrojo obtenida a partir de las imágenes infrarrojas en distintos rangos de detección para los distintos ratones estudiados ($n = 3$ para cada una de las cepas). Todos los datos fueron obtenidos usando como fuente de excitación un láser de 808 nm a una densidad de potencia de $0.2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$.

En este estudio sistemático observamos también que la autofluorescencia no era un problema únicamente a la hora de obtener imágenes *in vivo*, sino que también dificultaba en gran medida la realización de estudios de biodistribución *ex vivo*. Esto se debe a que determinados órganos presentan una elevada señal de fluorescencia en el infrarrojo, como podemos ver en la **Figura 4.3 (a)**, donde se muestran las imágenes infrarrojas obtenidas bajo excitación con 808 nm para los distintos órganos de un ratón albino analizados *ex vivo*. Podemos ver en esta figura que el hígado, el bazo y los riñones

muestran una intensa señal de fluorescencia en el infrarrojo, que se puede atribuir a la presencia de determinados fluoróforos endógenos (flavinas, lipofuscinas) en estos órganos. El estómago y el intestino también presentaban una clara señal de fluorescencia, aunque ésta variaba notablemente de un ratón a otro, por lo que concluimos que estos dos órganos presentan fluorescencia principalmente debido a la presencia de restos de comida.

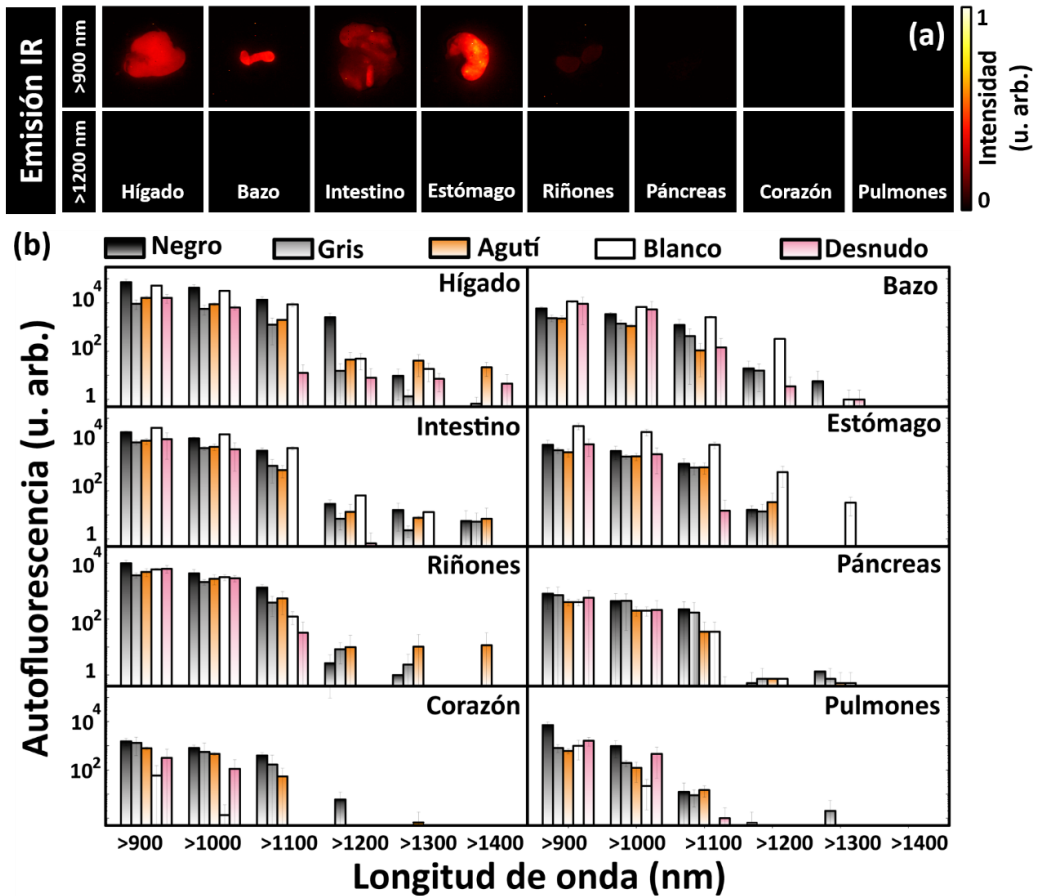


Figura 4.3. Autofluorescencia infrarroja *ex vivo*. (a) Imágenes de fluorescencia obtenidas para distintos órganos de un ratón albino en los rangos 900-1700 nm y 1200-1700 nm. (b) Intensidad de fluorescencia promedio obtenida para los órganos de los ratones de las cinco cepas analizadas en los mismos rangos de detección utilizados para el estudio *in vivo*. Como fuente de excitación se utilizó un láser de 808 nm a 0.2 W·cm⁻².

La **Figura 4.3 (b)**, donde se representa la intensidad promedio de fluorescencia de los distintos órganos de todas las cepas de ratones estudiadas en función de la longitud de onda, nos permite extraer dos conclusiones inmediatas. En primer lugar, se observa claramente que la autofluorescencia de los órganos es independiente de la cepa de ratón, con lo cual utilizar cepas sin pigmentación no supondría ninguna ventaja en el caso de realizar estudios de biodistribución *ex vivo* mediante imagen de fluorescencia. Por otro lado, podemos ver que la autofluorescencia de los distintos órganos es menos intensa a medida que aumenta la longitud de onda. Esto ocurriría también para la fluorescencia intrínseca de la comida y la autofluorescencia de los pigmentos cutáneos, lo que nos permitió plantear la obtención de imágenes *ex vivo* e *in vivo* libres de autofluorescencia limitando el rango de detección, como se describirá en el apartado siguiente.

4.2. Imágenes de alto contraste mediante filtrado espectral

Como explicamos en el apartado anterior, el fondo de autofluorescencia presente en las imágenes de fluorescencia *in vivo* y *ex vivo* es menos intenso cuanto más larga es la longitud de onda. Para longitudes de onda superiores a 1200 nm, la autofluorescencia es prácticamente inexistente. Esto hace posible, en principio, obtener imágenes de alto contraste utilizando NPs que presenten bandas de emisión por encima de 1200 nm, como es el caso de los materiales estudiados en el desarrollo de esta tesis. Para demostrar esta hipótesis utilizamos el montaje representado esquemáticamente en la **Figura 3.2**, en el que la rueda de filtros nos permite seleccionar el rango de detección adecuado.

4.2.1. Imágenes de alto contraste mediante filtrado espectral obtenidas con NPs dopadas con iones Nd^{3+} .

Como se describió en profundidad en el capítulo 2, las NPs dopadas con iones Nd^{3+} presentan bandas de emisión y excitación en las ventanas biológicas. Concretamente, bajo excitación en la primera ventana biológica, a longitudes de onda cercanas a 808 nm, podemos observar tres bandas de emisión, centradas en torno a 890, 1060 y 1340 nm, respectivamente. Esta última banda, como explicamos anteriormente, corresponde

a la transición ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ de los iones Nd^{3+} y generalmente representa entre un 10 y un 15% de la emisión total, es la que nos permitiría obtener imágenes libres de autofluorescencia mediante filtrado espectral. Podemos comprobar en la **Figura 4.4**, donde se muestra la autofluorescencia característica de una muestra de comida junto con la de una muestra de NPs de $\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$, que la única banda de emisión de las NPs que no se superpone a la autofluorescencia es aquella centrada en 1340 nm. Este mínimo solape abre la puerta a la obtención de imágenes de alto contraste utilizando la transición ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{13/2}$ de los iones Nd^{3+} , junto con un equipo de filtrado espectral que nos permita seleccionar exclusivamente esta banda de emisión.

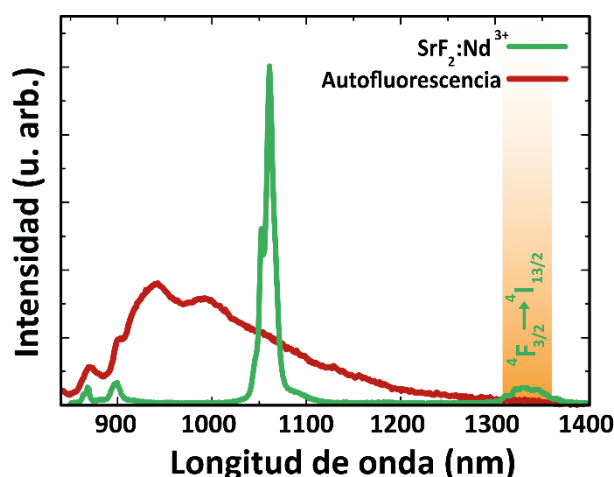


Figura 4.4. Autofluorescencia y emisión de NPs dopadas con Nd^{3+} en el infrarrojo. Espectros de emisión en el rango 850-1400 nm obtenidos para una muestra de pienso de ratón de laboratorio, como aparece representada en la Figura 4.1; y una dispersión acuosa de NPs de $\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$ bajo excitación con un láser de 808 nm.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se evaluaron las capacidades como agentes de contraste en imagen de fluorescencia en el infrarrojo de distintas NPs dopadas con iones Nd^{3+} . Debido a la similitud de sus propiedades espectroscópicas, en este apartado sólo se mostrarán, como ejemplo representativo, los resultados obtenidos para NPs de $\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$.

4.2.1.1. Toxicidad a nivel celular de las NPs de $\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$

Antes de plantear experimentos en modelos animales con cualquier tipo de NP, es necesario llevar a cabo estudios *in vitro* para evaluar sus posibles efectos tóxicos a nivel

celular. Para ello se utilizó el ensayo del MTT, como se explicó en detalle en la sección 3.4, a través del cual evaluamos la viabilidad de células HeLa incubadas en un medio con distintas concentraciones de NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$. En la **Figura 4.5** podemos ver los resultados de estos ensayos de toxicidad para concentraciones de NPs de 25, 50 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y tiempos de incubación de hasta 48 horas. Concluimos a partir de estos resultados que la viabilidad celular no se veía afectada por la presencia de las NPs en ninguno de los casos, con lo que procedimos a su estudiar su posible aplicación para imagen *in vivo*.

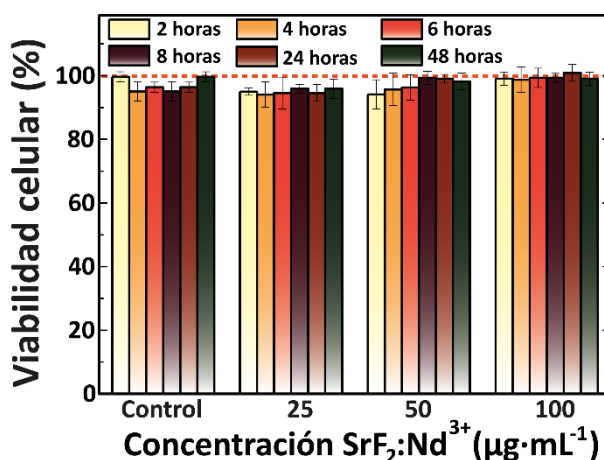


Figura 4.5. Toxicidad *in vitro* de las NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$. Resultados de los ensayos de viabilidad celular para tres concentraciones de estas NPs (25, 50 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y distintos tiempos de incubación. La línea discontinua, que indica el 100 % de viabilidad, se muestra como guía visual.

4.2.1.2. Imagen *in vivo* con NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$

En la **Figura 4.6 (a)** se muestran las imágenes de fluorescencia infrarroja (bajo excitación óptica con un láser de 808 nm) correspondientes a un *pellet* alimentario y a un tubo Eppendorf que contiene una dispersión acuosa de NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$. Podemos ver que, efectivamente, mediante filtrado espectral es posible aislar la fluorescencia de las NPs de la autofluorescencia infrarroja de la comida.

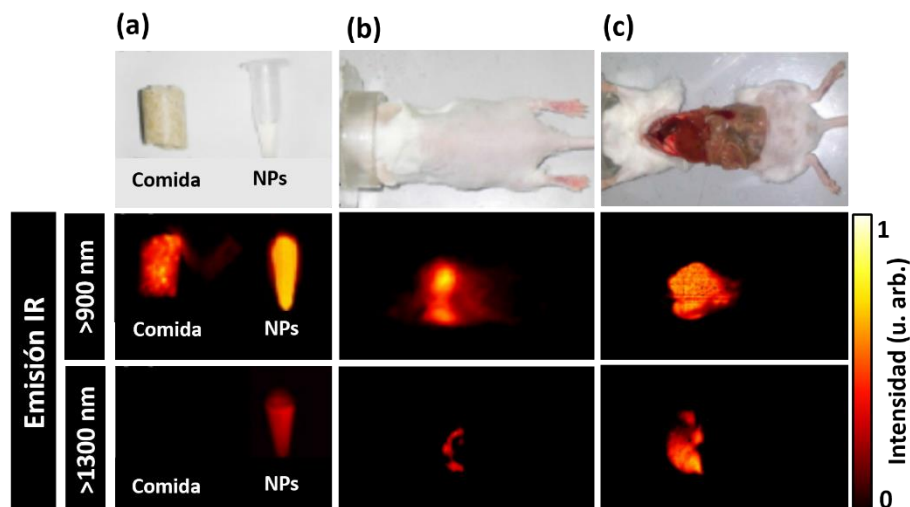


Figura 4.6. Filtrado espectral para bioimagen con NPs de $\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$. (a) Imágenes ópticas e infrarrojas (900-1700 nm y 1200-1700 nm) obtenidas para un pellet de pienso de ratón y una dispersión acuosa de NPs. (b) Mismas imágenes obtenidas *in vivo* para un ratón inoculado intravenosamente con 50 μL de una dispersión de NPs de $\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$ (3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS) una hora después de la inyección. (c) Imágenes óptica e infrarroja obtenidas *ex vivo* para el mismo ratón.

Para evaluar la posible aplicación de esta técnica *in vivo*, realizamos experimentos de bioimagen en un ratón albino, que fue inyectado por vía intravenosa con 50 μL de una dispersión de NPs de $\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$ en PBS (3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Una hora después de la inyección, se registraron las imágenes en el infrarrojo en distintos rangos espectrales, ajustando la densidad de potencia del láser (de 808 nm de longitud de onda) utilizado como fuente de excitación a 0.5 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.6 (b)**, donde podemos ver que la localización de las NPs no puede ser determinada con certeza a partir de la imagen obtenida a partir de la señal de fluorescencia integrada en el rango de detección 900-1700 nm. En este rango, pudimos observar un fondo de fluorescencia proveniente del cuerpo del ratón, con una señal especialmente intensa en la región del abdomen. La localización de esta señal corresponde a la región del estómago e hígado que, como indicamos en la sección anterior, presentan una intensa autofluorescencia en el infrarrojo. Al realizar el filtrado espectral, como se observa en la imagen de la derecha, la señal de fluorescencia queda claramente localizada en la región del hígado, indicando la presencia de NPs en este

órgano. Después de la obtención de las imágenes *in vivo*, el ratón fue sacrificado y diseccionado, de forma que pudimos obtener imágenes *ex vivo* del propio ratón, como se muestra en la **Figura 4.6 (c)**. A través de ellas, se confirmó la presencia de las NPs en el hígado, conclusión que no podría extraerse de la imagen infrarroja obtenida sin filtrado espectral, como vemos en la imagen central de la **Figura 4.6 (c)**, que muestra una fluorescencia mucho menos localizada.

4.2.1.3. Estudios de biodistribución *ex vivo* con NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$

Como parte final de los experimentos de bioimagen en el infrarrojo con NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$, analizamos la presencia de las NPs en los distintos órganos a través del análisis *ex vivo* de la fluorescencia de los mismos. A través de estos experimentos, pretendíamos evaluar si el filtrado espectral era también una herramienta útil para realizar estudios de biodistribución de NPs dopadas con iones Nd^{3+} . En la **Figura 4.7 (a)** se muestran las imágenes de fluorescencia (en los rangos 900-1700 nm y 1300-1700 nm) de los órganos estudiados. Podemos ver claramente que, de entre los órganos que presentaban fluorescencia en el rango 900-1700 nm, únicamente el hígado y el bazo seguían siendo fluorescentes en el rango 1300-1500 nm. De esta forma, podemos determinar que en el momento de sacrificar al ratón, una hora después de la inyección intravenosa, las NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$ se habían acumulado principalmente en estos dos órganos.

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos mediante el filtrado espectral, procedimos a analizar la dependencia temporal de la biodistribución de las NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$. Para ello, se sacrificaron cinco ratones albinos a distintos tiempos (1, 4, 24, 48 y 72 horas) después de la administración intravenosa de NPs (50 μL de una dispersión concentrada a 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS) para realizar un análisis *ex vivo* de la fluorescencia de sus órganos. Al igual que ocurría para el primer ratón analizado, únicamente el hígado y el bazo presentaban una señal de fluorescencia atribuible a las NPs. Si bien observamos una disminución de la intensidad total con el paso del tiempo, ambos órganos seguían conteniendo NPs 72 horas después de su administración, como se muestra en la **Figura 4.7 (b)**. En esta gráfica se representan las intensidades

medidas en hígado y bazo, así como la intensidad total para los distintos tiempos estudiados. Se puede apreciar en la figura una clara disminución de la intensidad total (y por tanto, de la concentración de NPs en el organismo) en las primeras 24 horas. Para tiempos más largos (48 y 72 horas), la intensidad registrada es muy similar a la observada a las 24 horas, indicando que una parte de las NPs no han sido eliminadas del organismo de los ratones. Podemos ver en mayor detalle la distribución de NPs entre el hígado y el bazo a distintos tiempos en la **Figura 4.7 (c)**. En esta figura se representan las intensidades (ponderadas por el peso de cada órgano) normalizadas al valor que presentaban a $t = 1$ hora. Podemos observar que, mientras la concentración de NPs en el hígado se redujo a las 24 horas hasta un 15 % de su valor inicial, durante este tiempo, la señal en el bazo se duplicó. Esto indica que, en estas primeras 24 horas hubo una transferencia de NPs entre ambos órganos. Para tiempos más largos, la concentración de NPs en el hígado se mantuvo estable en este valor, mientras que la observada en el bazo se redujo en las siguientes 48 horas (siendo, a las 72 horas, un 170 % mayor que la que presentaba a $t = 1$ hora). Estos resultados son consistentes con distintos estudios sobre biodistribución de NPs que se pueden encontrar en la literatura, que describen diferentes patrones de biodistribución en función de la carga superficial de las partículas. En el caso de las NPs con carga superficial negativa, como es el caso de las NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$ (que presentan un zeta potencial de -24.9 mV), se observa una acumulación preferencial en el hígado y el bazo, que se corresponde con lo que hemos medido en este apartado. Estos resultados nos indican que es necesario llevar a cabo una funcionalización superficial adecuada si queremos evitar la acumulación de las NPs en hígado y bazo tras la administración intravenosa. Esto es especialmente necesario para la aplicación de estas NPs como agentes de contraste en la obtención *in vivo* de imágenes anatómicas, del sistema cardiovascular o del sistema digestivo, así como en la detección de tumores mediante acumulación selectiva de NPs en los mismos.

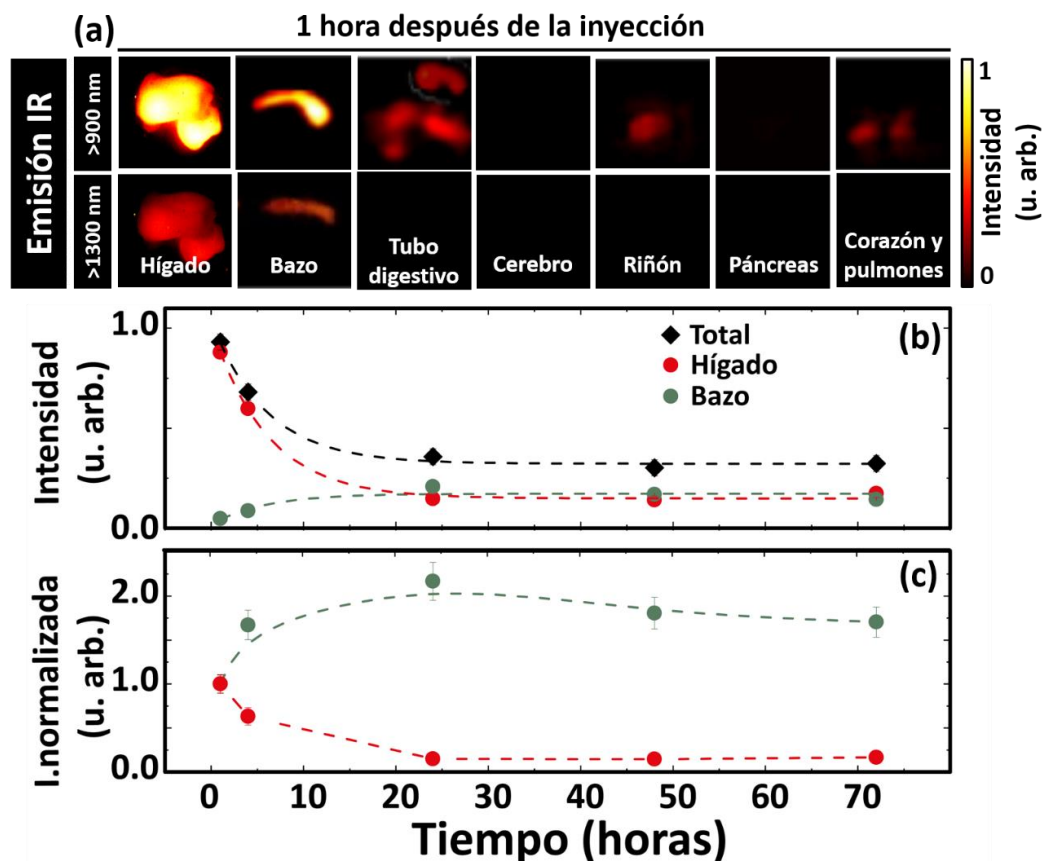


Figura 4.7. Biodistribución de las NPs de $\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$ inyectadas por vía intravenosa. (a) Imágenes de fluorescencia infrarroja de los órganos de un ratón sacrificado 1 hora después de ser inoculado con una dispersión de NPs ($3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS) en dos rangos espectrales: 900-1700 nm y 1300-1700 nm. (b) Evolución temporal de la intensidad correspondiente a las NPs (1300-1700 nm) medida en los órganos en los que se observó presencia de NPs (hígado y bazo) y la intensidad total. (c) Evolución temporal de la intensidad atribuible a las NPs presentes en hígado y bazo, normalizada por su valor a $t = 1$ hora. En ambos casos, los puntos son los datos experimentales y las líneas discontinuas actúan como guía visual.

4.2.2. Imágenes de alto contraste mediante filtrado espectral obtenidas con QDs

Como se comentó anteriormente, los QDs han sido ampliamente utilizados en imagen de fluorescencia en el visible debido a sus interesantes propiedades ópticas. Sin embargo, antes de la realización de esta tesis doctoral, no se habían explorado prácticamente sus aplicaciones para bioimagen *in vivo* debido a la falta de sistemas que

operasen en las ventanas biológicas. Los QDs de PbS/CdS/ZnS utilizados en el desarrollo de esta tesis presentan una banda de emisión centrada en 1270 nm, como se muestra en la **Figura 4.8** y son, por tanto, candidatos idóneos para experimentos de bioimagen utilizando la técnica de filtrado espectral.

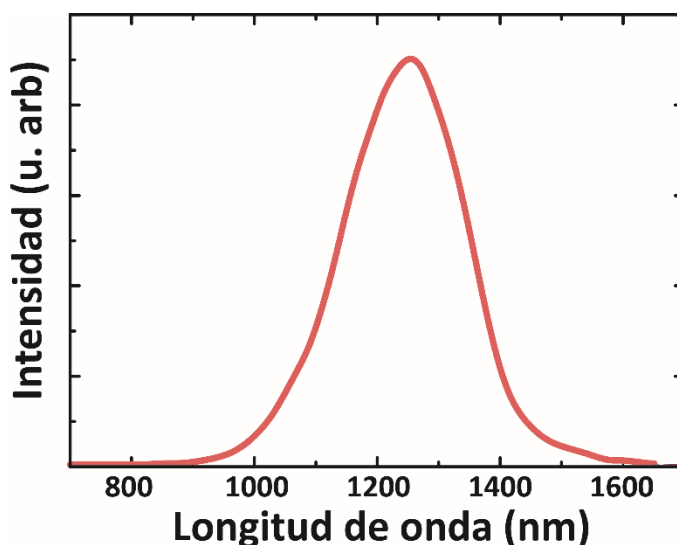


Figura 4.8. Emisión de los QDs de PbS/CdS/ZnS. Espectro de emisión en el rango 750-1650 nm obtenido bajo excitación con un láser de diodo de 808 nm de longitud de onda para una dispersión acuosa de QDs de PbS/CdS/ZnS a temperatura ambiente.

La ventaja que presentan los QDs frente a las NPs dopadas con iones Nd^{3+} es que permiten, en principio, obtener imágenes de alto contraste a concentraciones y/o densidades de potencia de excitación muy inferiores. Esto se debe principalmente a sus elevadas secciones eficaces de absorción ($\sim 10^{-16} \text{ cm}^2$ por QD), aproximadamente dos órdenes de magnitud superiores a las que presentan las NPs dopadas con iones Nd^{3+} . Además, la posición de la banda de emisión (centrada en 1270 nm) nos permite utilizar la técnica de filtrado espectral aprovechando completamente la señal de los QDs, mientras que en el caso de las NPs dopadas con iones Nd^{3+} es necesario limitarse a una banda relativamente poco intensa.

4.2.2.1. Toxicidad a nivel celular de los QDs de PbS/CdS/ZnS

Al igual que hicimos en el caso de las NPs de $\text{SrF}_2:\text{Nd}^{3+}$, antes de plantearnos la aplicación de nuestros QDs para imagen en modelos animales, evaluamos su toxicidad

in vitro a través de un ensayo MTT en células HeLa, como se detalla en la sección 3.4. Las células fueron incubadas durante tiempos entre 2 y 8 horas, como se muestra en la **Figura 4.9**, con dos concentraciones distintas de QDs (4 y $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

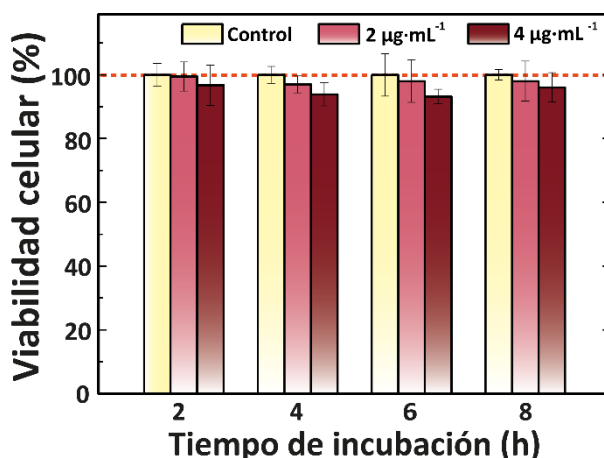


Figura 4.9. Toxicidad *in vitro* de los QDs de PbS/CdS/ZnS. Resultados de los ensayos de viabilidad celular para dos concentraciones de QDs (2 y $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y tiempos de incubación entre 2 y 8 horas. La línea discontinua, que indica el 100 % de viabilidad celular, se muestra como guía visual.

4.2.2.2. Imagen y biodistribución *in vivo* y *ex vivo* con QDs

Una vez comprobada su baja toxicidad a nivel celular, diseñamos y llevamos a cabo experimentos de imagen *in vivo* utilizando la técnica de filtrado espectral en combinación con estos QDs. Debido a su alto brillo, los tiempos de integración requeridos para obtener imágenes de alto contraste eran muy bajos. Esto nos permitió estudiar en tiempo real la biodistribución de los QDs en tres ratones, que recibieron una inyección de QDs ($100 \mu\text{L}$ de una dispersión concentrada a $0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS, lo que corresponde a una dosis $0.14 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) por vía intravenosa a través de la vena caudal. Para ello, monitorizamos la localización *in vivo* de los QDs tomando imágenes de fluorescencia infrarroja ($1200\text{-}1700 \text{ nm}$) de forma continua durante los 2 minutos siguientes a la inyección. Como fuente de excitación, al igual que en el caso de las NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$, utilizamos un láser de 808 nm , si bien con una densidad de potencia cinco veces menor ($0.1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$). En la **Figura 4.10 (a)** se muestran las imágenes obtenidas, a 30 y 120 segundos después de la inyección intravenosa de QDs, para uno de los

ratones. Podemos ver que, a los 30 segundos, cierta cantidad de QDs seguía localizada en la vena caudal, a la vez que se podía apreciar una señal clara proveniente del hígado y de los pulmones. Tras 120 segundos, sin embargo, no se observaba fluorescencia infrarroja (< 1200 nm) en la zona de los pulmones ni la vena caudal; localizándose toda la señal observada en el hígado. En la **Figura 4.10 (b)** se muestra la evolución temporal de la intensidad de fluorescencia, medida *in vivo*, en las zonas correspondientes a la vena caudal, los pulmones y el hígado del ratón. Podemos observar que, al cabo de dos minutos, los QDs han pasado a estar localizados casi exclusivamente en el hígado.

Para profundizar en estos datos de biodistribución y determinar inequívocamente la localización de los QDs en función del tiempo, así como su posible acumulación en el organismo, realizamos un análisis *ex vivo* de los órganos de dos ratones, sacrificados 50 segundos y 2 horas después de la administración de QDs. Como podemos ver en la **Figura 4.10 (c)**, donde se muestran las imágenes de fluorescencia de los órganos que presentaban emisión por encima de 1200 nm, a tiempos muy cortos (inferiores al minuto) se observaba una fluorescencia atribuible a los QDs en el hígado y en el bazo, así como en el corazón y en los pulmones. Esto indica que, tras su administración intravenosa, los QDs alcanzaron la circulación pulmonar para ser a continuación distribuidos por el organismo. Para tiempos más largos (2 minutos), no se apreciaba señal de emisión de los QDs en el sistema cardiovascular del ratón, mientras que la señal procedente del hígado y el bazo se había intensificado. Esto indica que los QDs estaban siendo eliminados de la circulación sanguínea y acumulándose en los órganos del sistema reticuloendotelial (hígado y bazo). Estos resultados están de acuerdo con lo descrito en la literatura para NPs de tamaño superior al límite de filtración glomerular, que no pueden ser eliminadas del organismo por vía renal. El hecho de que estos QDs no presentaran una funcionalización superficial con PEG para incrementar su tiempo de circulación en sangre resultó en una rápida captación por parte del hígado y el bazo. Este patrón de biodistribución es muy similar al que habíamos obtenido para las NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$ que, como discutimos en ese caso, es el comportamiento observado en general para las NPs con carga superficial negativa. Este es también el caso de los QDs utilizados en este apartado, cuyo zeta potencial es de -24.2 mV, por lo que los

resultados obtenidos son consistentes con el patrón de biodistribución reportado para NPs con estas características.

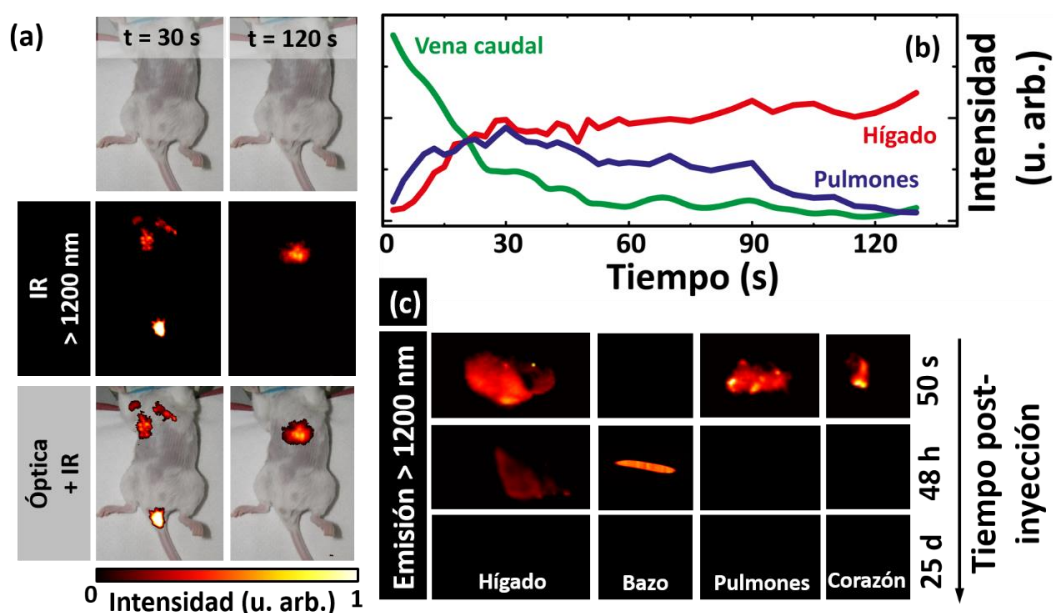


Figura 4.10. Biodistribución *in vivo* y *ex vivo* de QDs de PbS/CdS/ZnS. (a) Imágenes óptica, de fluorescencia infrarroja y superposición de ambas para un ratón inyectado intravenosamente con una dispersión de QDs ($0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS) 30 y 120 segundos después de la inyección. (b) Evolución temporal de la intensidad de fluorescencia *in vivo*, obtenida a partir de una secuencia de imágenes como las mostradas en (a), en las áreas correspondientes a la vena caudal, los pulmones y el hígado. (c) Imágenes de fluorescencia infrarroja obtenidas *ex vivo* para ratones sacrificados a distintos tiempos (50 segundos, 48 horas y 25 días) después de la inyección intravenosa de QDs. En todos los casos, las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas en el rango 1200-1700 nm bajo excitación con un láser de 808 nm trabajando a una densidad de potencia de $0.1 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$.

En el caso de los QDs no se llevó a cabo un estudio tan exhaustivo de la biodistribución en función del tiempo como habíamos hecho para las NPs de $\text{SrF}_2\text{:Nd}^{3+}$. Sin embargo, sí se evaluó la presencia de QDs en el organismo de los ratones a tiempos más largos que en el caso anterior, sacrificando al ratón restante 25 días después de la inyección para proceder al análisis *ex vivo* de sus órganos. Como podemos ver en la **Figura 4.10 (c)**, ninguno de los órganos presentaba fluorescencia apreciable por encima de 1200 nm. No obstante, estos resultados no permiten concluir de forma inequívoca que los QDs se han eliminado completamente del organismo en este

periodo. Después de su acumulación en hígado y bazo, los QDs podrían haberse eliminado del organismo por vía biliar, como se ha reportado en la literatura para otras NPs.[Yu 2015] Sin embargo, este proceso es relativamente lento, ocurriendo en la escala de meses/años, por lo que no sería esperable en este caso observar una eliminación total de los QDs al cabo de 25 días. La ausencia de fluorescencia podría indicar también una degradación de los QDs en el hígado, de forma que su emisión característica dejaría de estar presente aunque los materiales constituyentes no se hubieran eliminado del organismo. Para confirmar alguna de estas dos hipótesis, realizamos experimentos de espectrometría de masas en los distintos órganos del ratón sacrificado a los 25 días después de la inyección intravenosa de QDs, así como en los de un ratón control. A través de estos experimentos, cuyos resultados se muestran en la **Figura 4.11**, observamos la presencia de Pb y Cd en varios órganos del ratón inoculado con QDs, concretamente en el hígado, bazo, riñones, páncreas y pulmones.

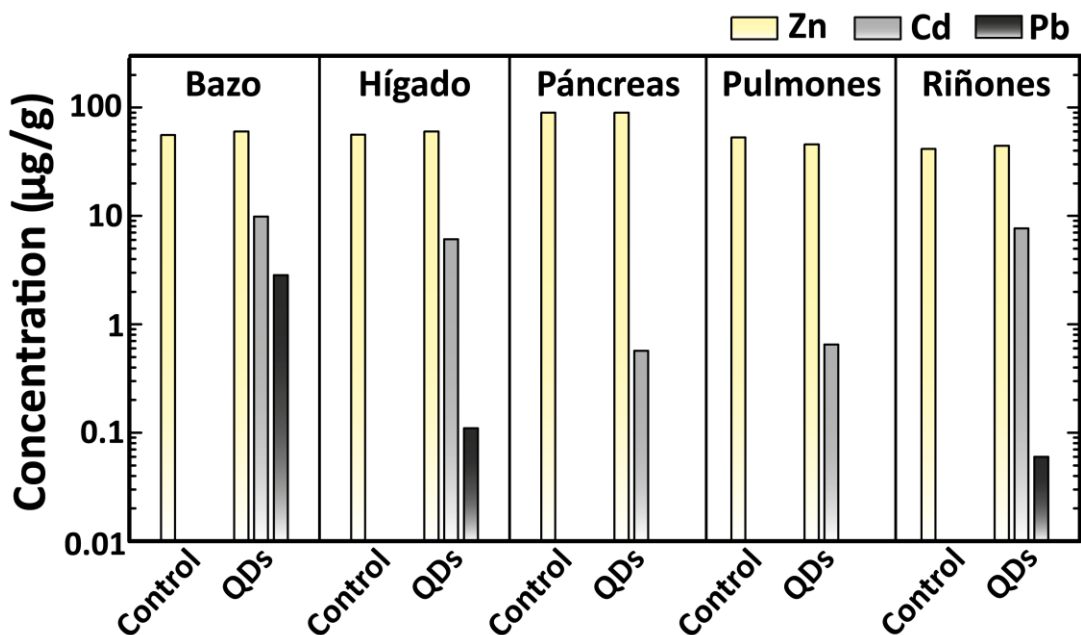


Figura 4.11. Biodistribución *ex vivo* de QDs: espectrometría de masas. Presencia de los elementos constituyentes de los QDs (Zn, Cd y Pb) en distintos órganos de un ratón sacrificado 25 días después de ser inyectado con QDs por vía intravenosa y de un ratón control. Sólo se observa presencia de Cd y Pb en el ratón inoculado con QDs.

Como podemos ver en la **Figura 4.11**, ambos ratones presentan niveles similares de Zn en los órganos estudiados. Esto era esperable teniendo en cuenta que se trata de un elemento esencial, es decir, que su presencia es necesaria para el funcionamiento correcto del organismo.[Frassinetti 2006] Por el contrario, el ratón control no presenta niveles detectables de Pb ni Cd en ninguno de los órganos, por lo que podemos relacionar inequívocamente su presencia en el organismo con la inyección intravenosa de QDs. Esto nos indica que los elementos constituyentes de los QDs siguen presentes en los órganos aunque no observemos su fluorescencia, cuya pérdida, a un nivel de señal por debajo del límite de detección de nuestro sistema experimental, se puede atribuir a una degradación de los QDs. Estos resultados están de acuerdo con la degradación de QDs de composición similar observada en presencia de ciertas moléculas, concretamente HClO y H₂O₂, presentes en el organismo como resultado del metabolismo celular.[Mancini 2008] Estos compuestos son capaces de oxidar el S presente en las distintas capas de los QDs, lo que genera defectos en la red cristalina y permite que se liberen al medio sus metales constituyentes. Este proceso explica también la presencia de Pb y Cd en los riñones, que tras la administración intravenosa no presentaban ninguna fluorescencia atribuible a los QDs, lo que indica que éstos no eran capaces de traspasar la barrera de filtración glomerular, que sólo es permeable a partículas de muy pequeño tamaño (inferiores a 6-8 nm, dependiendo de la carga y ligando superficial).[Longmire 2008] Para estos QDs, cuyo diámetro promedio obtenido a través de las imágenes de TEM no alcanzaba los 6 nm, se observó un diámetro hidrodinámico de 26 nm (ver **Tabla 3.3**), lo que explica que no pudieran ser filtrados por los riñones. De forma general, incluso las NPs ultrapequeñas (diámetros inferiores a 6 nm), la agregación y la adsorción de proteínas séricas al ser introducidas en medios biológicos resulta en un aumento del diámetro hidrodinámico que imposibilita su eliminación por vía renal. el diámetro hidrodinámico supera [Hong 2012, Yu 2015] Aunque los QDs de PbS/CdS/ZnS no sean capaces de traspasar la barrera de filtración glomerular, las especies metálicas libres resultantes de su degradación, particularmente el Cd, sí podrían acumularse en los riñones, como ya se había observado anteriormente en experimentos de biodistribución de QDs basados en

Cd.[Hauck 2010, Ye 2012] La menor presencia relativa de Pb en los órganos analizados se puede explicar teniendo en cuenta que este metal se acumula preferencialmente en el tejido óseo, que no fue analizado en este experimento, mientras que el Cd se acumula preferencialmente en el riñón y, en menor medida, en el hígado.[Barry 1975, Brzóska 2001]

Teniendo en cuentas estos resultados, podemos concluir que los QDs se eliminaron rápidamente de la circulación sanguínea y se localizaron en los órganos del sistema reticuloendotelial, donde experimentaron una degradación progresiva. Esto resultó en una pérdida de su fluorescencia generando especies libres metálicas de Cd y Pb, que se acumularon en el organismo del ratón. Es importante remarcar en este punto que la dosis de QDs inyectada (4 μg , que equivale a $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), suficiente para hacer imagen de alto contraste en tiempo real, es extremadamente baja. Para NPs de composición similar, no se han observado efectos tóxicos a concentraciones mucho más elevadas (de hasta $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). [Gao 2004]

4.3. Imágenes de alto contraste mediante filtrado temporal con NPs dopadas con iones Nd^{3+}

Hasta ahora, hemos descrito cómo obtener imágenes infrarrojas libres de autofluorescencia aprovechándonos de una de las características de ésta: su baja intensidad a longitudes de onda relativamente largas. La fluorescencia de los compuestos orgánicos responsables de la autofluorescencia tiene, sin embargo, otra propiedad que pudimos aprovechar para conseguir imágenes de alto contraste: su extremadamente corta vida media. Debido a que las emisiones de fluorescencia de los compuestos orgánicos se generan a partir de transiciones permitidas, sus tiempos de vida media están, generalmente, en el orden de los nanosegundos. Al tratar de determinar experimentalmente el decaimiento temporal de la autofluorescencia, observamos que éste era demasiado rápido para poder ser detectado con nuestro sistema experimental, cuyo tiempo de respuesta está en el orden de los 8 ns. Este rápido decaimiento contrasta con las largas vidas medias (típicamente, del orden de

microsegundos) que presentan las NPs dopadas con iones Nd^{3+} , como describimos en la sección 2.1.1.

Esta gran diferencia entre los tiempos de vida media de fluorescencia de los compuestos orgánicos responsables de la autofluorescencia y las NPs dopadas con iones Nd^{3+} nos sirvió como punto de partida para desarrollar un sistema de filtrado temporal capaz de generar imágenes infrarrojas libres de autofluorescencia. El objetivo de este sistema era eliminar la contribución de las señales de vida media más corta a la imagen. A la hora de trabajar con NPs dopadas con iones Nd^{3+} , resulta más adecuado utilizar esta técnica de filtrado temporal que la de filtrado espectral mostrada en la sección anterior. Esto se debe a que obtener imágenes libres de autofluorescencia mediante filtrado espectral requiere seleccionar longitudes de onda superiores a los 1200 nm. En el caso de las NPs dopadas con iones Nd^{3+} , esto implicaba seleccionar únicamente la banda de emisión centrada en torno a 1340 nm, que como indicamos anteriormente, no representa más de un 20 % de la emisión total. En cambio, utilizando la técnica de filtrado temporal, sería posible obtener imágenes libres de autofluorescencia aprovechando más eficientemente la emisión de los iones Nd^{3+} , al no ser necesario eliminar la contribución de las bandas centradas en torno a 890 y 1060 nm.

Para llevar a cabo el filtrado temporal de las imágenes, modificamos nuestro sistema de imagen infrarroja sustituyendo el láser continuo utilizado como fuente de excitación por un láser pulsado con el objetivo de utilizar el final del pulso láser como disparador de la cámara infrarroja. Como se explica en detalle en la sección 3.2.2, entre el láser y la cámara introdujimos un circuito retardador que permitía comenzar la adquisición de imágenes un determinado tiempo (t_r , entre 1 y 200 μs) después del final de cada pulso láser.

A modo de ejemplo representativo, en este apartado se mostrarán los resultados obtenidos para NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$ de 500 nm de diámetro, que presentaban un tiempo de vida media (obtenido a partir de la curva de decaimiento mostrada en la **Figura 4.12 (a)**) de $90 \pm 7 \mu\text{s}$. La elección de estas NPs, cuyo tamaño es relativamente

elevado en comparación con el del resto de sistemas estudiados en esta tesis, estuvo motivada por su especialmente larga vida media. Como se indicó en el capítulo 2, las vidas medias de fluorescencia de los iones Nd^{3+} presentes en las NPs difieren sustancialmente de las vidas medias de estos iones observadas en los materiales en volumen y dependen de numerosos factores. Entre ellos, el tamaño de las NPs es un factor clave, de forma que NPs de idéntica composición presentan vidas medias más largas cuanto mayor es su tamaño. Podemos ver en la **Figura 4.12 (a)**, a modo de comparación, la curva de decaimiento de las NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$ de 20 nm diámetro. La vida media de estas NPs, obtenida a partir del ajuste exponencial mostrado en la figura, era de $3.2 \pm 0.2 \mu\text{s}$. Para comprobar que el sistema de filtrado temporal, efectivamente, adecuado para nuestro objetivo de eliminar la contribución de la autofluorescencia sin reducir de forma significativa la señal de las NPs, estudiamos el efecto sobre ambas emisiones de introducir un tiempo de retardo mínimo ($t_r = 1 \mu\text{s}$) en la adquisición de imagen. Podemos ver las imágenes infrarrojas obtenidas (en el rango completo de detección de la cámara, 900-1700 nm) bajo excitación con un láser de 808 nm para un *pellet* alimentario y una cubeta rellena con una dispersión acuosa de NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$ en la **Figura 4.12 (b)**. Mientras que ambas muestras presentaban fluorescencia infrarroja si no se introducía retardo entre el final del pulso y la adquisición de la imagen, un tiempo de retardo de $1 \mu\text{s}$ fue suficiente para hacer indetectable la contribución de la autofluorescencia sin afectar prácticamente a la intensidad emitida por las NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$. Al incrementar el tiempo de retardo entre el fin del pulso láser y la adquisición de la imagen sí observamos una disminución de la intensidad registrada, aunque incluso para el tiempo de retardo más largo ($t_r = 200 \mu\text{s}$) seguimos siendo capaces de detectar la emisión de las NPs, como se puede ver en la **Figura 4.12 (c)**.

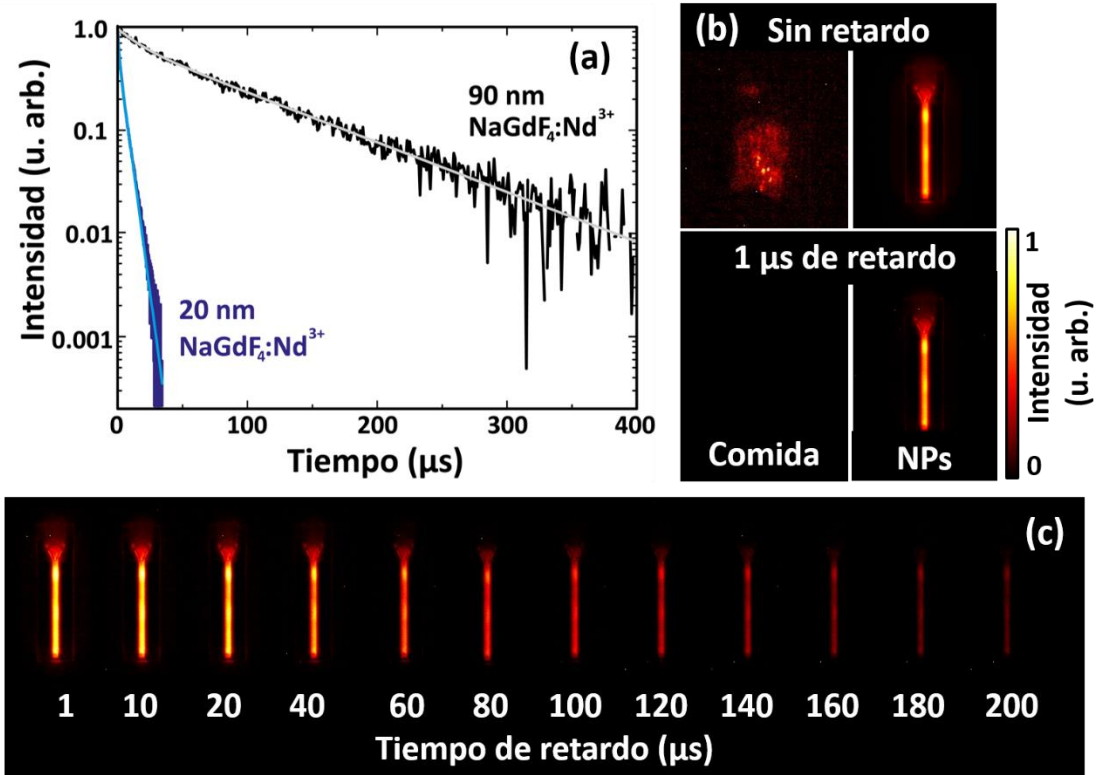


Figura 4.12. Vida media de NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$ e imagen con filtrado temporal. (a) Decaimiento de la fluorescencia de las NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$ de 20 y 500 nm de diámetro. En ambos casos se muestra el mejor ajuste a una curva exponencial. (b) Imágenes de fluorescencia infrarroja para un *pellet* alimentario y una cubeta que contiene una dispersión acuosa de NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$ (500 nm de diámetro) para tiempos de retardo de 0 y 1 μs entre el fin del pulso láser y la adquisición de la imagen. (c) Imágenes de fluorescencia obtenidas para la dispersión acuosa de NPs de 500 nm de diámetro para distintos tiempos de retardo. Todas las imágenes fueron obtenidas en el rango de detección 850-1700 nm bajo excitación con 808 nm.

En este caso, debido al tamaño relativamente grande de las NPs (≈ 520 nm) y a la ausencia de recubrimiento superficial, su estabilidad en medio de cultivo celular no era la idónea para realizar estudios de toxicidad *in vitro*. Por tanto, realizamos un estudio exhaustivo de su posible toxicidad *in vivo* a través de experimentos en jaula metabólica, que se discutirán en profundidad en la sección 4.4. Podemos adelantar, no obstante, que los resultados de dichos experimentos no indicaron ningún efecto tóxico asociado a la administración oral o intravenosa de estas NPs, por lo que fueron empleadas para experimentos de bioimagen *in vivo*.

A diferencia de lo llevado a cabo en experimentos anteriores, que se realizaron sobre ratones albinos y afeitados, en este caso utilizamos ratones de pigmentación más oscura sin afeitar para determinar si, incluso en esas condiciones, éramos capaces de eliminar completamente la autofluorescencia y aislar correctamente la emisión de las NPs. En las **Figura 4.13 (a) y (b)** podemos ver las imágenes obtenidas, con y sin retardo entre el pulso láser y la adquisición de la imagen, para un ratón que recibió una inyección subcutánea de NPs ($100\ \mu\text{L}$ de una dispersión concentrada a $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Queda patente en estas imágenes que, al introducir un tiempo de retardo de $1\ \mu\text{s}$, eliminamos completamente el fondo de autofluorescencia presente cuando $t_r = 0$. La localización de la inyección de NPs quedó, de esta manera, mucho mejor delimitada, como se puede ver en los perfiles de intensidad representados en las **Figura 4.13 (c) y (d)**, que corresponden a $t_r = 0$ y $t_r = 1\ \mu\text{s}$, respectivamente.

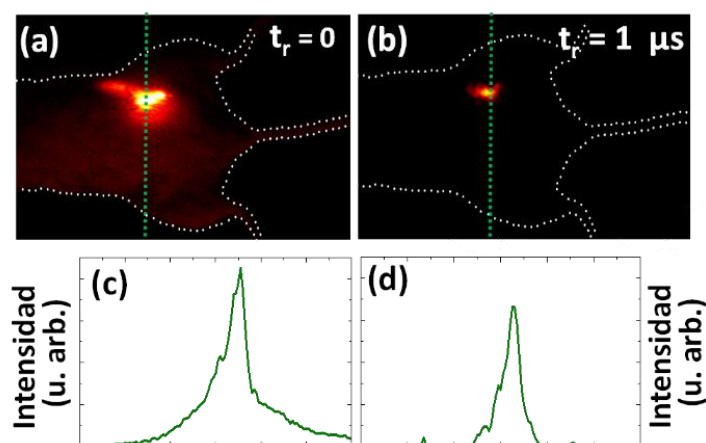


Figura 4.13. Imagen *in vivo* con filtrado temporal de inyección subcutánea de NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$. (a) y (b) Imágenes de fluorescencia infrarroja (850-1700 nm) obtenidas para un ratón inyectado subcutáneamente con $100\ \mu\text{L}$ de una dispersión $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de NPs. Como fuente de excitación se utilizó un láser pulsado de 808 nm; y se aplicó un tiempo de retardo, t_r , de 0 (a) y $1\ \mu\text{s}$ (b) entre el fin del pulso láser y la adquisición de la imagen. La silueta del cuerpo del ratón se representa en línea discontinua blanca como guía visual. (c) y (d) Perfiles de intensidad de fluorescencia obtenidos a lo largo de las líneas discontinuas representadas en las imágenes de (a) y (b).

Por último, estudiamos la posibilidad de utilizar este sistema para obtener imágenes de alto contraste *in vivo* del tubo digestivo. Para ello, administramos por vía oral $200\ \mu\text{L}$ de una dispersión acuosa de NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$ ($10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a tres

ratones, mientras que utilizamos otro de ellos como control. Como hemos explicado a lo largo de este capítulo, el tubo digestivo suele presentar una elevada autofluorescencia debido a la presencia de restos de comida, incluso después de haber mantenido a los ratones en ayunas durante 24 horas. En la **Figura 4.14** se muestran las imágenes obtenidas, para $t_r = 0$ y $t_r = 1 \mu s$, correspondientes al ratón control y a uno de los ratones que inoculado con NPs. La toma de imágenes se realizó cinco minutos después de la administración de las NPs por vía oral. Podemos ver que en ambos casos el cuerpo del ratón presentaba una clara señal de autofluorescencia, que para el ratón control era más intensa en la región del abdomen, correspondiendo probablemente a la autofluorescencia del hígado. El ratón inoculado con NPs presentaba, además, una señal especialmente intensa en un lateral del abdomen, si bien para $t_r = 0$ no era posible delimitar con exactitud si esto se correspondía con la presencia de las NPs en el estómago. En cambio, en las imágenes obtenidas para $t_r = 1 \mu s$ (en las que ha desaparecido completamente la autofluorescencia del ratón control), sí era posible delimitar con mayor precisión la localización de las NPs. Cinco minutos después de su administración por vía oral, las NPs se encontraban principalmente en el estómago y, en mucha menor proporción, en el intestino delgado.

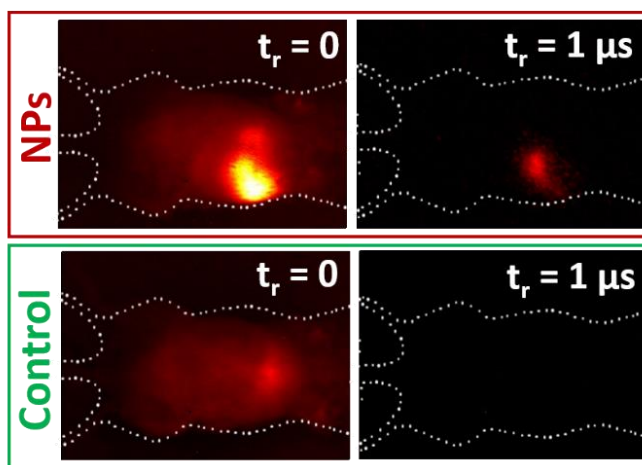


Figura 4.14. Filtrado temporal para imagen *in vivo* de NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$ administradas por vía oral. Imágenes de fluorescencia infrarroja (850-1700 nm) obtenidas, en las mismas condiciones que en la figura 3.11, en este caso dos ratones, a uno de los cuales se le habían administrado NPs por vía oral (200 μL de una dispersión 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). El otro de los ratones fue utilizado como control.

Esta conclusión, extraída a partir de las imágenes *in vivo*, fue corroborada después del análisis *ex vivo* de los órganos de los cuatro ratones que habían recibido NPs por vía oral, que fueron sacrificados a distintos tiempos para realizar así un estudio de la biodistribución. En la **Figura 4.15 (a)** se muestran las imágenes de fluorescencia del estómago y el intestino del ratón control y del ratón sacrificado 5 minutos después de ser inoculado oralmente con NPs. Podemos ver que ambos presentaban señal de fluorescencia cuando $t_r = 0$, que sin embargo, desaparecía completamente para el ratón control cuando se introduce el retardo en la adquisición de imágenes. La presencia de NPs era evidente en el estómago del otro ratón, que mostraba una intensa emisión para $t_r = 1 \mu s$, al igual que el intestino, si bien la señal en este caso era mucho más leve, lo que indica que en el momento del sacrificio la mayor parte de las NPs seguían localizadas en el estómago. El resto de órganos, como se muestra en la **Figura 4.15 (b)** no presentaban ninguna señal para $t_r = 1 \mu s$, al igual que los órganos del ratón utilizado como control. Toda la señal observada para $t_r = 0$ puede atribuirse a la autofluorescencia intrínseca de estos órganos, que se describió en detalle en la sección 4.1.

Para determinar la biodistribución de las NPs a tiempos más largos después de su administración por vía oral, los tres ratones restantes fueron sacrificados 15, 30 y 120 minutos después de la administración oral de NPs. Las imágenes infrarrojas obtenidas para los distintos órganos de estos ratones se muestran en la **Figura 4.15 (c)**, donde se puede apreciar claramente que la señal generada en el estómago disminuía de forma marcada con el tiempo. Podemos observar también que, dos horas después, no era posible detectar ninguna señal asociada a las NPs en los órganos del tubo digestivo. Con el objetivo de determinar si las NPs se estaban acumulando en el organismo de los ratones, también realizamos el análisis *ex vivo* del resto de los órganos. Sin embargo, ninguno de ellos presentaba una emisión detectable en el infrarrojo para $t_r = 1 \mu s$, lo que nos indica que, en el plazo de dos horas, las NPs no se habían acumulado preferencialmente en ningún órgano. El tamaño de estas NPs hace imposible su eliminación del organismo por vía urinaria, que, de acuerdo con la literatura, tras ser absorbidas se depositarían en los órganos del sistema reticuloendotelial para ser

eliminados lentamente por vía biliar. Sin embargo, estudios relativos a la biodistribución de NPs por vía oral indican que la absorción de las NPs a través de la barrera intestinal es altamente dependiente del tamaño. Concretamente, los autores observaron que NPs esféricas de oro de 200 nm de diámetro eran eliminadas prácticamente en su totalidad a través de las heces, absorbiéndose sólo un 0.01 % de las NPs administradas. Esto nos sugiere que, con total probabilidad, las NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$ fueron eliminadas tras su administración sin ser prácticamente absorbidas por la barrera intestinal.

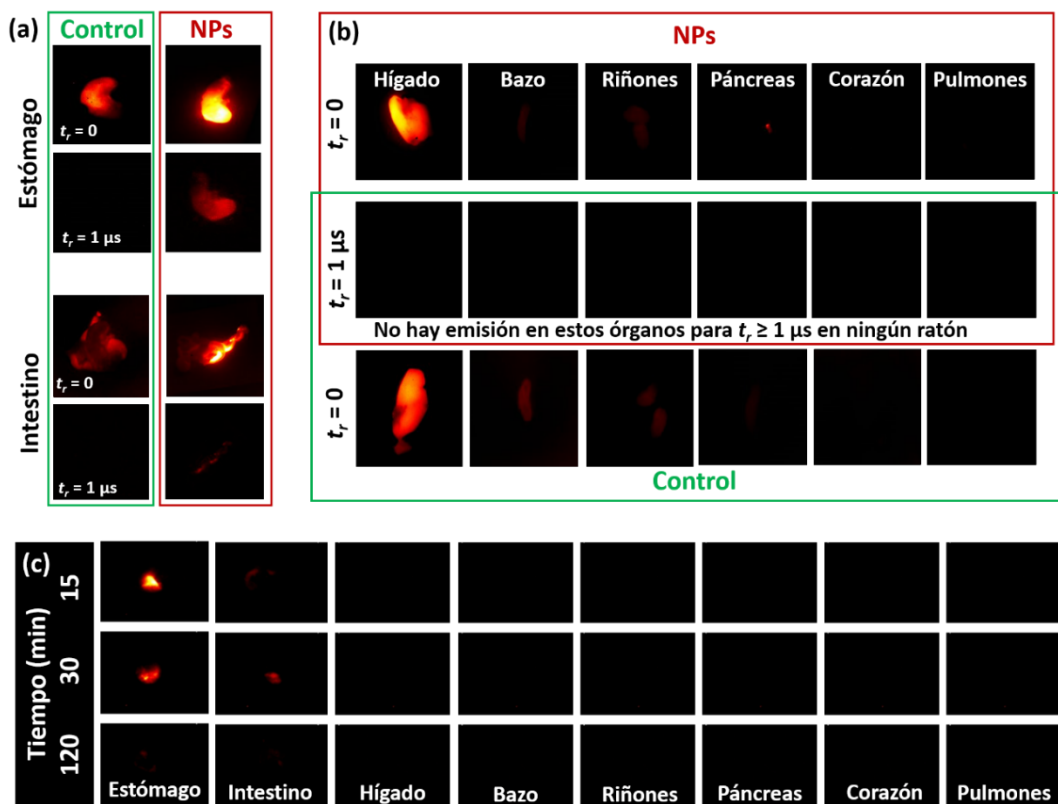


Figura 4.15. Filtrado temporal para biodistribución *ex vivo* de NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$. (a) Imágenes de fluorescencia infrarroja correspondientes al estómago y el intestino de un ratón control y de un ratón que había recibido NPs por vía oral ($200 \mu\text{L}$ a $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 5 minutos antes de ser sacrificado, para tiempos de retardo $t_r = 0$ y $1 \mu s$. (b) Imágenes obtenidas para el resto de órganos de estos dos ratones. (c) Imágenes de fluorescencia obtenidas con un tiempo de retardo de $1 \mu s$ para todos los órganos analizados correspondientes a ratones sacrificados 15, 30 y 120 minutos después de la administración oral de NPs.

4.4. Experimentos de biocompatibilidad de las NPs usadas para bioimagen

Como última parte de este capítulo, se describirán los estudios de biocompatibilidad que realizamos en jaula metabólica para dos de las NPs utilizadas para bioimagen *in vivo* en el desarrollo de esta tesis. Debido a limitaciones de tiempo, sólo fue posible realizar estos experimentos para algunas de las NPs, por lo que seleccionamos las NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$ y los QDs de PbS/CdS/ZnS . Las razones que motivaron la elección de estos dos sistemas para estos experimentos fueron las siguientes:

- Los QDs de PbS/CdS/ZnS , a pesar de haber mostrado una muy baja citotoxicidad en ensayos *in vitro*, suscitan mayores reservas en la comunidad científica a la hora de aplicarlos como agentes de contraste para bioimagen *in vivo* debido a la presencia de metales pesados en su composición. Como explicamos anteriormente, la capa más externa de los QDs, compuesta de ZnS , es altamente biocompatible y se había diseñado con el objetivo de actuar de barrera entre los metales pesados de las capas más internas de los QDs y el organismo. No obstante, los resultados descritos en la sección 3.2 para el ratón inoculado con QDs por vía intravenosa, nos indicaron que existía una degradación de los QDs debida a su interacción con ciertas moléculas generadas en el metabolismo celular que resultaba en la liberación y posterior acumulación de Pb y Cd . Aunque la dosis suministrada para llevar a cabo experimentos de imagen con éxito era muy inferior a la considerada tóxica de acuerdo con la literatura, un estudio en profundidad de la biocompatibilidad *in vivo* nos resultaba imprescindible para determinar había algún efecto en el comportamiento de los ratones atribuible a la toxicidad de los componentes de los QDs.
- Para las NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$, cuya estabilidad en medio de cultivo celular no era totalmente adecuada para llevar a cabo un ensayo de viabilidad celular, planteamos un estudio de su toxicidad *in vivo*. Además, su elevado tamaño en

comparación con las NPs habitualmente utilizadas en biomedicina generaba dudas sobre su posible toxicidad. Para determinar si existía algún efecto tóxico asociado directamente al tamaño de las NPs. Para ello, realizamos el mismo tipo de ensayos para dos tamaños de NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$: las de mayor tamaño (≈ 500 nm) utilizadas para los experimentos de filtrado espectral descritos en el apartado anterior y otras de tamaño mucho más reducido (≈ 20 nm), que no habíamos utilizado para los experimentos anteriores debido a su inferior vida media.

Como describimos en detalle en la sección 3.5.2, se utilizaron para estos experimentos un total de 16 ratones, dos de los cuales fueron utilizados como control. Los ratones restantes fueron inoculados por vía oral o intravenosa con alguna de las NPs estudiadas: QDs de $\text{PbS}/\text{CdS}/\text{ZnS}$ (3 ratones por vía oral y 3 por vía intravenosa) o $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$ de 500 y 20 nm (3 ratones por vía oral, 1 ratón por vía intravenosa para cada uno de los tamaños). Durante cuatro días, se monitorizaron distintas variables relacionadas con la actividad metabólica de los animales.

Los resultados obtenidos para los QDs se resumen en las **Figura 4.16** (ingesta de comida y agua), **Figura 4.17** (parámetros relacionados con el movimiento) y **Figura 4.18** (parámetros termodinámicos).

En cuanto a la alimentación y consumo de agua, como se muestra en la **Figura 4.16**, no existen diferencias significativas entre los ratones inoculados con QDs y los respectivos casos control. Vemos que los ratones que habían recibido QDs (o agua, en el caso del ratón control) por vía oral mostraban una ingesta de comida levemente inferior a los que habían sido inyectados por vía intravenosa. Esta diferencia era más marcada en el caso del consumo de agua, que al cabo de 96 horas era aproximadamente un 25% inferior para el grupo de ratones de administración oral con respecto al grupo de administración intravenosa. No obstante, teniendo en cuenta los datos del ratón control, este efecto parece atribuible al proceso de administración de un líquido por sonda y no a la presencia o no de QDs en ese líquido. No existen, por tanto, diferencias significativas en cuanto al consumo de comida y agua que podamos relacionar inequívocamente con la presencia de QDs en el organismo de los ratones.

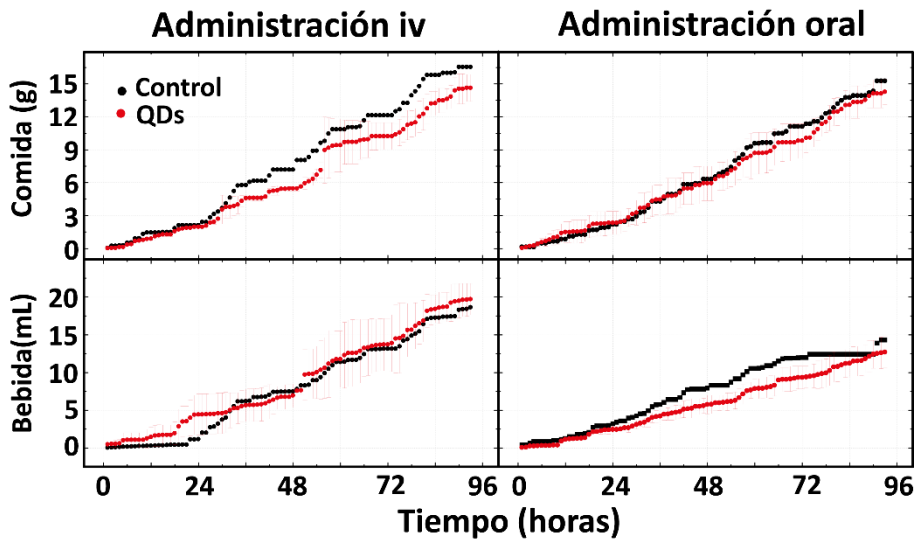


Figura 4.16. Consumo de pienso y agua para ratones inoculados con QDs. Ingesta acumulada de comida y agua durante 96 horas para los ratones inoculados con QDs por vía intravenosa ($100\ \mu\text{L}$ a una concentración de $0.05\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) o por vía oral ($200\ \mu\text{L}$ a una concentración de $0.1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). En ambos casos, aparecen representados los datos medidos para los correspondientes ratones control.

En la **Figura 4.17** se muestran los datos obtenidos para distintos parámetros relacionados con el movimiento: distancia total recorrida por los ratones, suma de movimientos centrales y suma de movimientos periféricos. Estos dos últimos corresponden al número de veces que se ha detectado movimiento de los ratones en el área central o en el área periférica (próxima a los bordes) de las jaulas, respectivamente. En ellos podemos apreciar una serie de picos de mayor movimiento seguidos por periodos de inactividad, que se corresponden con los ciclos de actividad de los ratones. Podemos ver en esta figura que no existen diferencias entre el caso control y los ratones inyectados con NPs para el grupo de administración intravenosa. Por el contrario, sí existe una marcada diferencia en el grupo de administración oral, en el que el ratón control presentaba un nivel de actividad mucho más elevado que los ratones que sí habían sido inyectados con QDs. Sin embargo, comparando los datos de ambos grupos, podemos ver que la actividad de ambos ratones control no es similar, sino que el del grupo de administración oral mostró un mayor nivel de movimiento en todo momento, como podemos ver en las gráficas correspondientes a la suma de

movimientos centrales y periféricos. De esta forma, al final del experimento, la distancia total recorrida por este ratón superaba los 3 km, mientras que el resto de ratones (incluido el control del grupo de administración intravenosa) no alcanzaba los 2 km. Estos datos no permiten extraer resultados concluyentes al respecto de los efectos de los QDs administrados por vía oral sobre el nivel de actividad de los ratones, de forma que se requiere realizar experimentos adicionales (que por limitaciones de tiempo no han sido realizados en el marco de esta tesis), con un mayor número de ratones control para evitar problemas como los aquí observados.

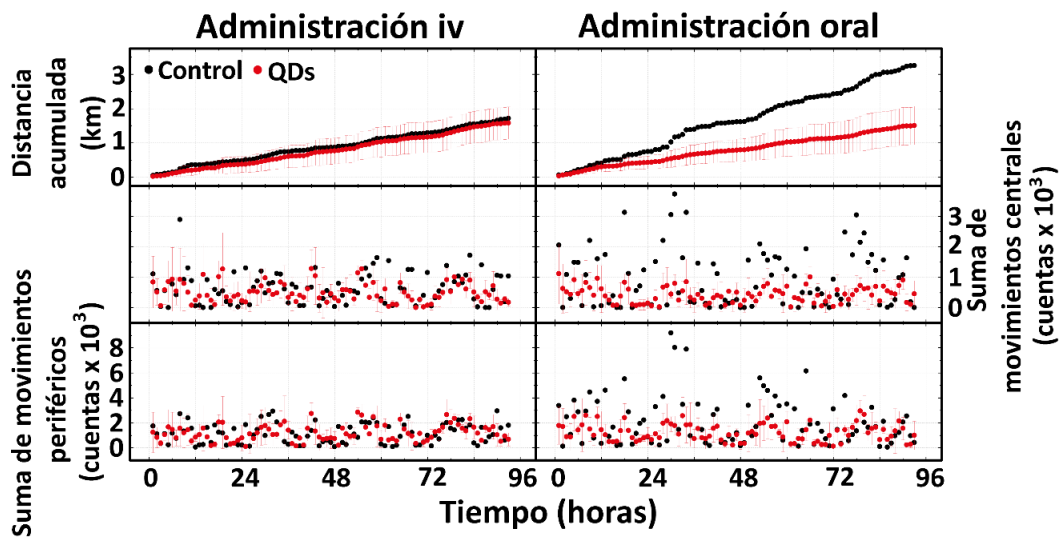


Figura 4.17. Movimiento observado para ratones inoculados con QDs. Distancia total acumulada, suma de movimientos centrales y suma de movimientos periféricos para ratones inoculados con QDs por vía intravenosa (100 μL a una concentración de 0.05 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) o por vía oral (200 μL a una concentración de 0.1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), así como para los ratones control.

Los parámetros termodinámicos relacionados con la actividad metabólica, como son la temperatura, la tasa de intercambio respiratorio (RER por sus siglas en inglés, *Respiratory Exchange Rate*, que se corresponde a la relación entre el volumen de CO_2 espirado y el volumen de O_2 inspirado) y la producción de calor se muestran en la **Figura 4.18**. En primer lugar, podemos ver que en todos los casos se midió una variación cíclica de la temperatura, que está asociado a los ritmos circadianos de los ratones. Variaciones como las observadas para los ratones aquí estudiados, entre 1 y 4

°C, se pueden considerar normales, sin apreciarse ningún efecto significativo debido a la presencia de QDs. Este tipo de variaciones cíclicas se observaron también en los datos del RER, que mide de manera indirecta la capacidad oxidativa de los músculos para obtener energía; y por tanto varía de acuerdo con los ciclos de actividad del ratón. En este parámetro, al igual que en la producción de calor (indicador de la actividad metabólica de los ratones), no se detectaron diferencias significativas entre los ratones control y los inoculados con QDs por vía intravenosa. En cuanto a los ratones inoculados con QDs por vía oral, sí se apreciaron diferencias en la producción de calor con respecto al caso control. Sin embargo, éstas son atribuibles al mayor nivel de actividad de este ratón, como ya hemos comentado al discutir los datos registrados relativos al movimiento de los ratones.

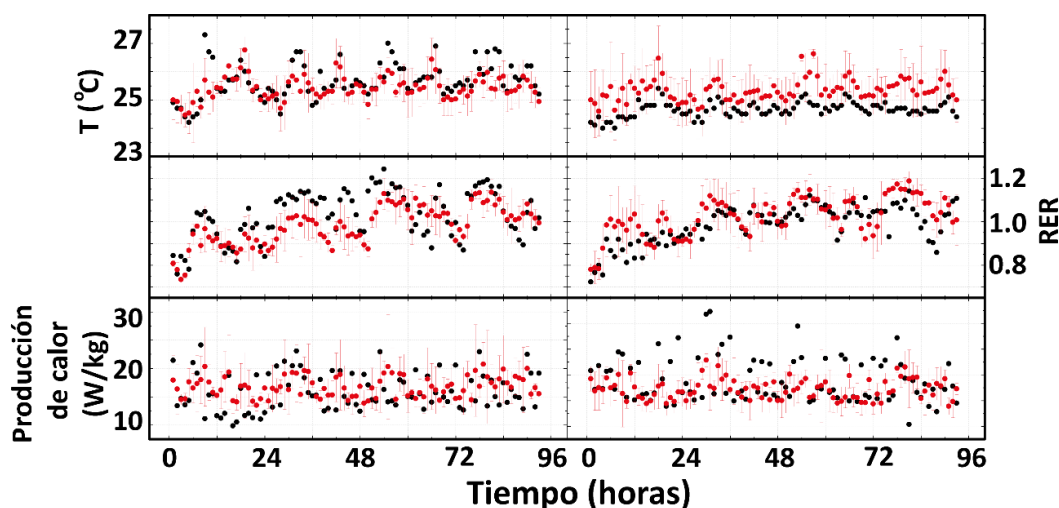


Figura 4.18. Parámetros termodinámicos medidos para ratones inoculados con QDs. Temperatura, tasa de intercambio respiratorio (RER) y producción de calor para ratones inoculados con QDs por vía intravenosa ($100 \mu\text{L}$ a una concentración de $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) o por vía oral ($200 \mu\text{L}$ a una concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) medidos durante 4 días después de la administración de los QDs. Se muestran en cada caso los datos correspondientes a los ratones control.

Los datos obtenidos para las NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$ de dos diámetros diferentes ($\approx 20 \text{ nm}$ y $\approx 500 \text{ nm}$) se muestran, de la misma forma, en las **Figura 4.19**, **Figura 4.20** y **Figura 4.21**.

Los datos registrados para la ingesta de comida y agua, como podemos ver en la **Figura 4.19** no revelan diferencias significativas entre los ratones inoculados con NPs y los ratones control, observándose únicamente un consumo de pienso ligeramente inferior para el ratón que había sido inoculado las NPs más pequeñas por vía intravenosa. Al igual que ocurría en el caso de los QDs (ver **Figura 4.16**), los ratones del grupo de administración oral presentan un consumo inferior de agua al del grupo de administración intravenosa. Podemos concluir a partir de estos datos que la disminución del consumo de agua se debe, con total probabilidad, a la técnica por la que se administraron las NPs (y el agua, en el caso del ratón control) por vía oral.

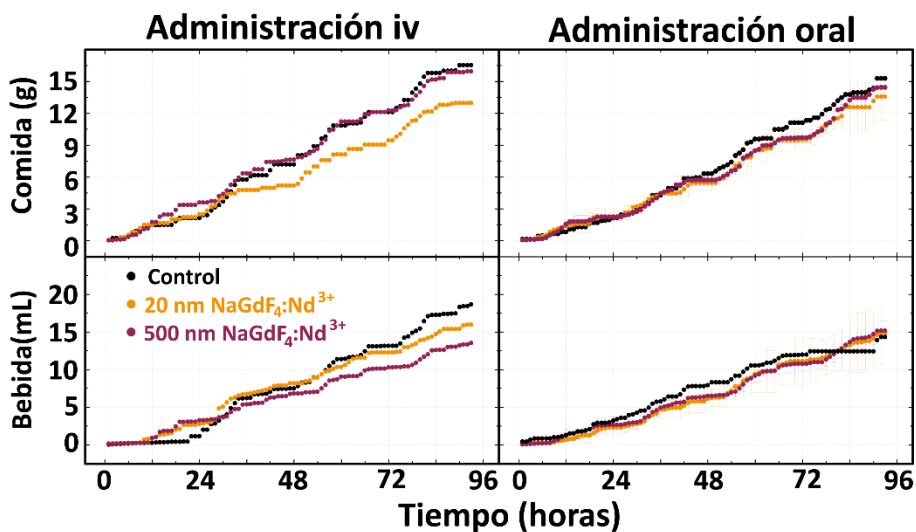


Figura 4.19. Consumo de pienso y agua para ratones inoculados con NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$. Ingesta acumulada de comida y agua durante 96 horas para los ratones inoculados con NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$ (de 20 y 500 nm de diámetro) por vía intravenosa (100 μL a una concentración de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) o por vía oral (200 μL a una concentración de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). En ambos casos aparecen representados los datos medidos para los correspondientes ratones control.

En cuanto a los parámetros relacionados con el movimiento de los ratones (**Figura 4.20**), los resultados obtenidos son también muy similares a los observados para los ratones inoculados con QDs (**Figura 4.17**). Podemos ver que todos los ratones presentan niveles de actividad similares salvo el ratón control del grupo de administración oral, cuyos picos de actividad son mucho más elevados. Debido a que ni siquiera para el otro ratón control se observó una actividad tan alta y a que los datos

son muy similares independientemente del tipo de NP (QDs o $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$), podemos concluir que estos resultados no indican que exista un efecto tóxico de las NPs sobre los ratones. Sin embargo, como indicamos en el caso de los QDs, estudios adicionales con un mayor número de ratones control son necesarios para descartar inequívocamente un efecto de las NPs sobre el nivel de actividad de los ratones.

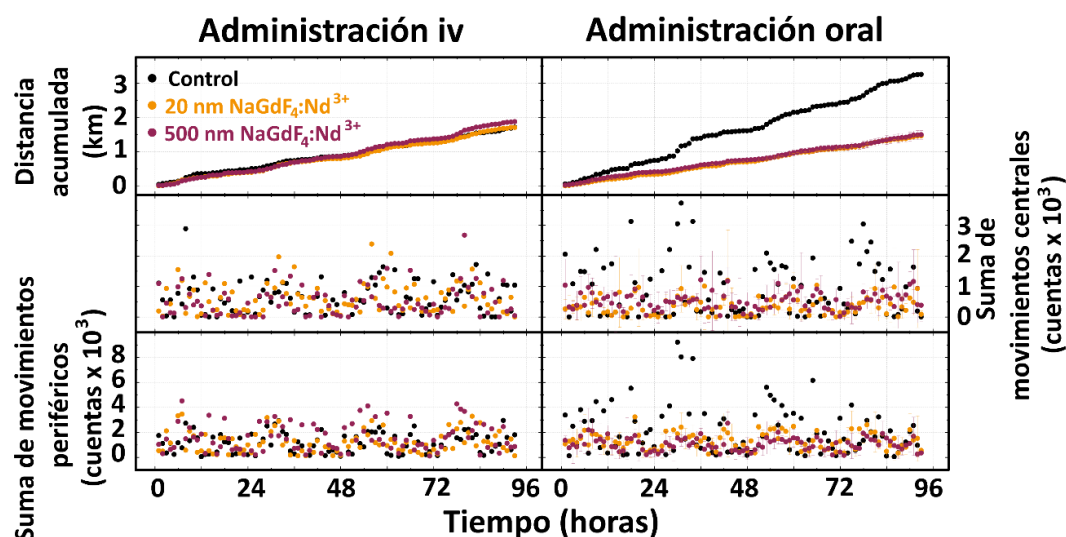


Figura 4.20. Movimiento observado para ratones inoculados con NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$. Distancia total acumulada, suma de movimientos centrales y suma de movimientos periféricos para ratones inoculados con NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$ (de 20 y 500 nm de diámetro) por vía intravenosa ($100\ \mu\text{L}$ a una concentración de $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) o por vía oral ($200\ \mu\text{L}$ a una concentración de $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), así como para los casos control.

Por último, en cuanto a las variables relacionadas con la temperatura y el metabolismo (**Figura 4.21**), sólo se observan diferencias apreciables en la producción de calor de los ratones del grupo de administración oral, al igual que ocurría para los QDs. Como comentamos anteriormente, esta relativamente elevada producción de calor se debe a la mayor actividad del ratón control.

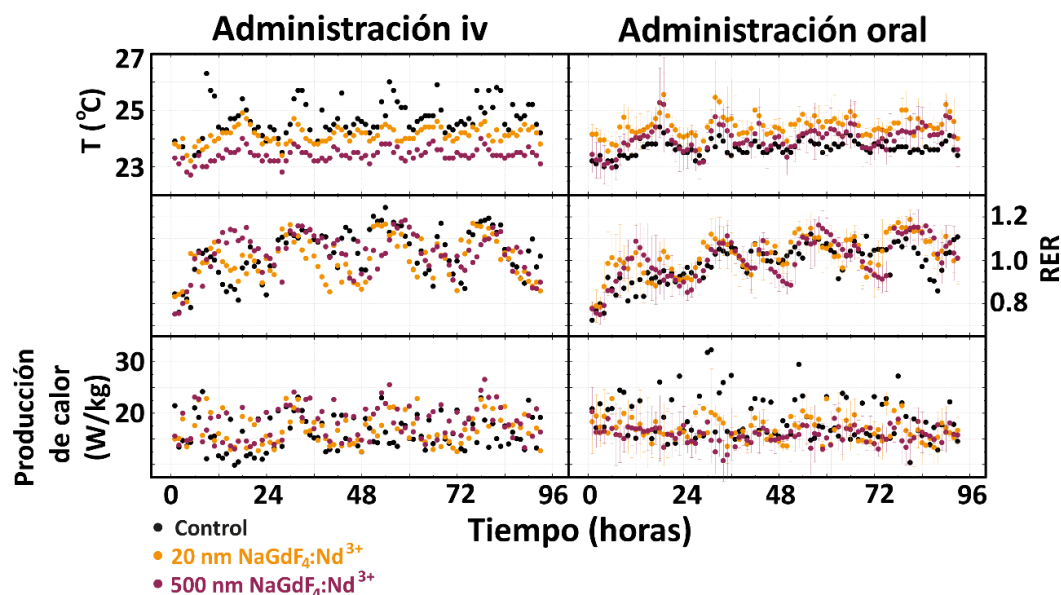


Figura 4.21. Parámetros termodinámicos medidos para ratones inoculados con NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$. Temperatura, tasa de intercambio respiratorio (RER) y producción de calor para ratones inoculados con NPs de $\text{NaGdF}_4:\text{Nd}^{3+}$ (de 20 y 500 nm de diámetro) por vía intravenosa (100 μL a una concentración de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) o por vía oral (200 μL a una concentración de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), durante los 4 días siguientes a la administración de las NPs. Se muestran también los datos registrados para los ratones utilizados como control.

Como parte final del experimento de biocompatibilidad, se estudió la evolución del peso de los ratones, comparando el que presentaban al inicio del experimento con el medido 5 y 10 días después de la administración de las NPs. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.22**, donde podemos apreciar que todos los ratones, incluidos aquellos utilizados como control, habían experimentado una cierta pérdida de peso durante los 5 días que permanecieron en las jaulas metabólicas. Esta pérdida de peso se puede calificar, de acuerdo con la literatura, como leve (inferior al 10% de su peso inicial) o moderada (inferior al 20% de su peso inicial). Este peso perdido se recuperó parcialmente en prácticamente todos los casos durante los 5 días siguientes, durante los cuales los ratones estuvieron estabulados en sus condiciones habituales.

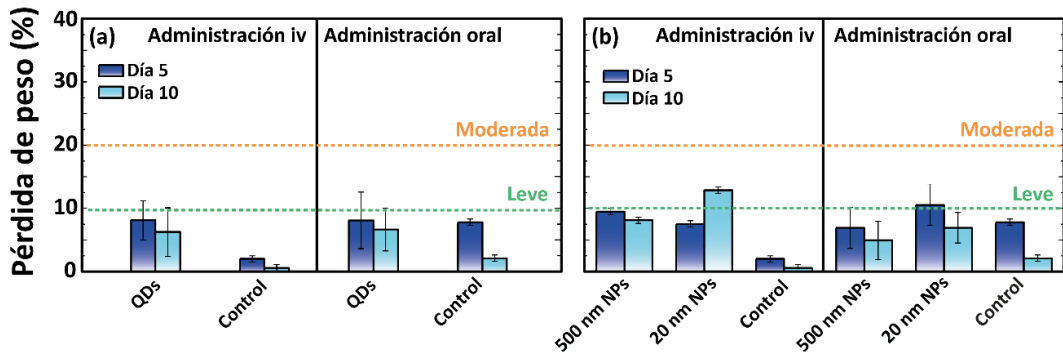


Figura 4.22. Evolución del peso de los ratones después de la administración de NPs. Evolución del peso de los ratones que recibieron (a) QDs y (b) NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$ por vía intravenosa u oral, expresada como % de peso perdido con respecto al que presentaban el día de administración de las NPs. Se presentan los datos medidos al final de la estancia de los ratones en las jaulas metabólicas (día 5) y 5 días después de la misma (día 10).

De los resultados descritos en este apartado podemos concluir que los efectos fisiológicos de los QDs y las NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$ en el organismo de los ratones durante el periodo estudiado son leves. Podemos descartar por tanto que exista una toxicidad aguda asociada a las NPs en las concentraciones estudiadas en este trabajo. De la misma forma, podemos afirmar que las NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$ producen efectos similares en los ratones independientemente de su tamaño, ya que no existen diferencias significativas entre los resultados observados para las NPs de 20 y 500 nm de diámetro.

En cualquier caso, es necesario realizar estudios de toxicidad *in vivo* a medio y largo plazo antes de afirmar de forma inequívoca que se trata de sistemas biocompatibles.

5. Terapia fototérmica controlada

5.1. Terapia fototérmica controlada mediante NPs dopadas con iones Nd^{3+}

Las NPs dopadas con iones Nd^{3+} , como se ha explicado en capítulos anteriores, son especialmente interesantes para experimentos de bioimagen debido a que operan en las ventanas biológicas. El hecho de que presenten un máximo de excitación en torno a 808 nm es particularmente ventajoso, ya que esta longitud de onda, que es muy poco absorbida por los tejidos biológicos, se puede obtener utilizando diodos láser comerciales y muy asequibles. No obstante, antes de la realización de esta tesis no se había explorado su potencial como agentes para terapia térmica.

Como ya se mencionó en la introducción, los materiales estudiados hasta el momento para terapia fototérmica en modelos animales presentaban dos limitaciones principales. Por un lado, la imposibilidad de detectar su localización en el organismo de manera sencilla; y por otro lado, la ausencia de un método que permitiese determinar la temperatura intratumoral real durante el tratamiento. Ajustando de manera adecuada el contenido de Nd^{3+} dentro de las NPs, es posible conseguir sistemas multifuncionales capaces de generar simultáneamente calor y fluorescencia bajo excitación con una única fuente láser. En algunos casos, es posible incluso explotar la sensibilidad a la temperatura de la emisión del Nd^{3+} , de forma que las mismas NPs que actúan como agentes terapéuticos permiten determinar en tiempo real la temperatura de su entorno.

Entre las distintas NPs dopadas con iones Nd^{3+} que fueron estudiadas como agentes de contraste para imagen de fluorescencia en las ventanas biológicas, dos de ellas se utilizaron, además, como nanocalentadores para terapia fototérmica: las NPs ultrapequeñas de NdVO_4 y las NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ dopadas con un 25% molar de Nd^{3+} . Como se explicó en el capítulo 2, el elevado contenido de Nd^{3+} en estos sistemas resulta en una mayor proporción de procesos de desexcitación no radiativa con respecto a los sistemas dopados con una menor concentración de Nd^{3+} lo que, como veremos a lo largo de esta sección, los convierte en agentes interesantes para terapia fototérmica. Las NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ presentan, además, una marcada sensibilidad de su fluorescencia

a la temperatura, lo que permite utilizarlas como agentes multifuncionales en terapia fototérmica con control de temperatura.

5.1.1. Nanopartículas de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$

5.1.1.1. Nanopartículas de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ como nanotermómetros fluorescentes

En trabajos previos al desarrollo de esta tesis, se habían estudiado las posibles aplicaciones de las NPs de LaF_3 en bioimagen y termometría a través de distintos experimentos *ex vivo*. Su banda de emisión en la primera ventana biológica resultó especialmente interesante para este trabajo, ya que su dependencia con la temperatura permitió emplear estas NPs como nanotermómetros. Como se puede ver en la **Figura 5.1 (a)**, donde se representa el espectro de emisión correspondiente a la transición $^4\text{F}_{3/2} \rightarrow ^4\text{I}_{9/2}$ de los iones Nd^{3+} en las NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ a tres temperaturas diferentes, la forma de la banda de emisión es sensible a variaciones térmicas. El ratio entre los picos de emisión centrados en aproximadamente 865 y 890 nm varía linealmente con la temperatura, como se puede ver en la curva de calibración representada en la **Figura 5.1 (b)**. A partir de esta curva de calibración podemos determinar la sensibilidad térmica de las NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$, que se puede expresar como:

$$S_R = \frac{1}{R} \frac{dR}{dT} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

donde R representa el ratio entre las bandas IR1 e IR2 (ver **Figura 5.1 (a)**) y T , la temperatura. Obtenemos, a partir de nuestros resultados experimentales, una sensibilidad del $0.25\% \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$ a 33°C . En su momento, esta sensibilidad constituía la más alta obtenida para un nanotermómetro fluorescente capaz de operar en las ventanas biológicas, si bien ya ha sido superado por diversos sistemas, como se observa en la **Figura 1.5**.

Es importante remarcar en este punto que el hecho de que la medida de temperatura proporcionada por estas NPs, al venir dada por un cambio ratiométrico, es independiente de fluctuaciones locales en la intensidad de excitación o en la concentración de NPs.

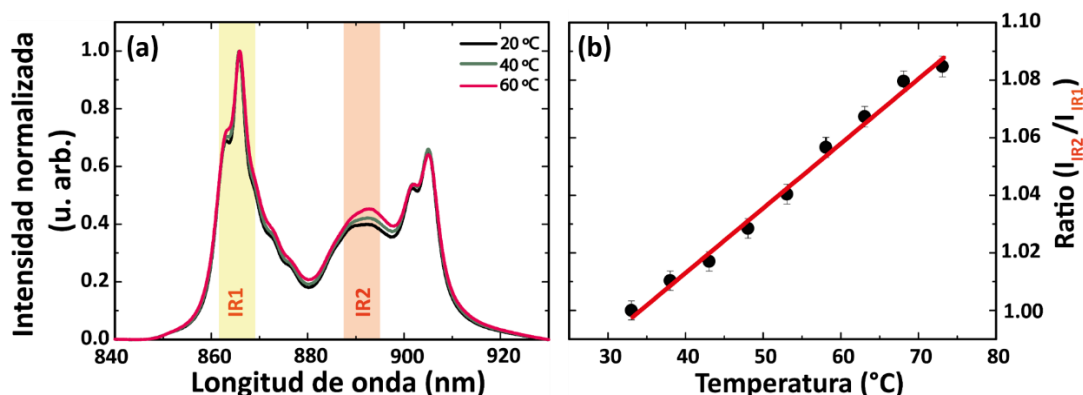


Figura 5.1. Sensibilidad a la temperatura de las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$ (25% mol.) (a) Espectro de emisión normalizado de las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$ en el rango 840-930 nm a 20, 40 y 60 °C. Las bandas cuyo ratio varía con la temperatura, centradas alrededor de 865 y 891 nm, se encuentran indicadas en la figura como IR1 e IR2, respectivamente. (b) Curva de calibración correspondiente al ratio entre las intensidades en los rangos de longitudes de onda señaladas en (a). Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que la línea indica el mejor ajuste de dichos puntos a una recta.

5.1.1.2. Nanopartículas de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$ como agentes fototérmicos

Una vez determinada su sensibilidad térmica, procedimos a evaluar la posibilidad de utilizar estas NPs como agentes fototérmicos. Para ello, analizamos el incremento de temperatura máximo bajo excitación con radiación de 808 nm ($4 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) para muestras de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$ con porcentajes molares de dopaje entre el 1 y el 25 %. En la **Figura 5.2** podemos ver que, efectivamente, contenidos más elevados de Nd^{3+} resultan en mayores incrementos de temperatura, que llegan a superar los 16 °C en el caso de las NPs dopadas con un 25% molar de Nd^{3+} (en una dispersión acuosa a $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). La mayor eficiencia de calentamiento de las NPs más dopadas tiene como contrapunto una reducción en la eficiencia cuántica, que resulta en una disminución de la señal de emisión, como se muestra también en la **Figura 5.2**. Esto se debe, como se explicó en el capítulo 2, a la activación de procesos de relajación cruzada y de migración de energía al aumentar en contenido de Nd^{3+} , así como a la presencia de un mayor número de defectos que resulta en una mayor relevancia de los procesos de desexcitación no radiativa. La emisión más intensa se observa para las NPs con un 2% molar de Nd^{3+} , mientras que la correspondiente a las NPs con un 25% molar de Nd^{3+} es aproximadamente 10 veces inferior. No obstante, a pesar ser relativamente poco

intensa, la fluorescencia de las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$ (25% mol.) puede ser utilizada para evaluar la temperatura durante experimentos de terapia fototérmica *in vivo*.

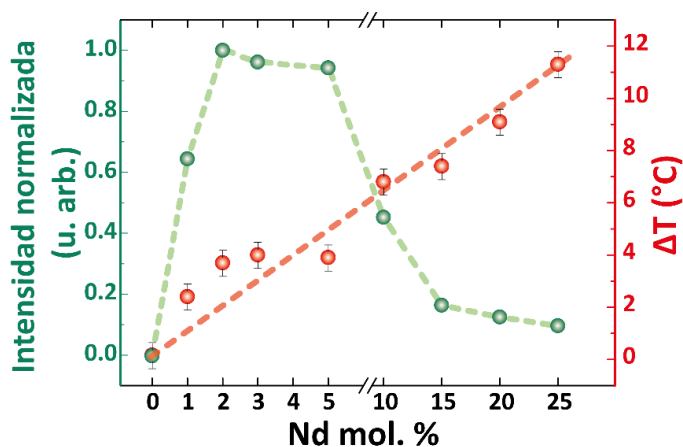


Figura 5.2. Fluorescencia y conversión fototérmica de las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$. Intensidad de emisión de fluorescencia (en el rango 850-1700 nm) e incremento de temperatura máximo para dispersiones acuosas de NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$ (10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) dopadas con porcentajes molares de Nd^{3+} entre el 0 y el 25%. Como fuente de excitación se utilizó un diodo láser de 808 nm a 4 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$.

5.1.1.3. Toxicidad a nivel celular de las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$

El último paso previo a la aplicación de estas NPs en terapia fototérmica en modelos animales consistió en la evaluación de su toxicidad a nivel celular. Para ello, se analizó la viabilidad celular de células HeLa incubadas con diferentes concentraciones de NPs (200 y 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) durante tiempos de incubación de hasta 24 horas. Los resultados, que se muestran en la **Figura 5.3**, indican que para las condiciones estudiadas las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$ no afectan de forma apreciable a la viabilidad celular, por lo que procedimos a utilizar estas NPs para su aplicación en terapia fototérmica en un modelo murino de tumor.

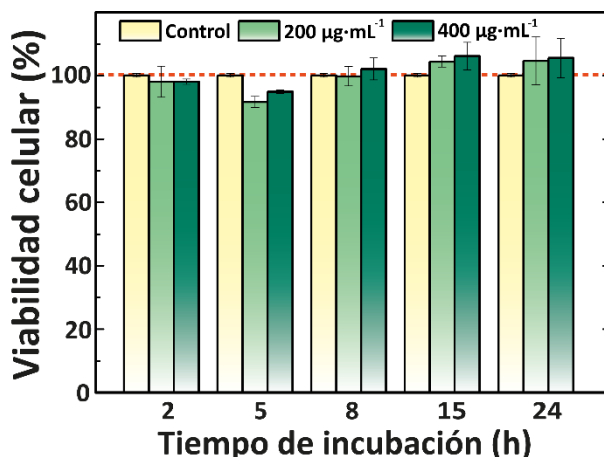


Figura 5.3. Toxicidad *in vitro* de las NPs de LaF₃:Nd³⁺ (25% mol.) en la línea celular HeLa. Resultados de los experimentos de toxicidad celular para distintos tiempos de incubación con estas NPs a dos concentraciones diferentes (200 y 400 µg·mL⁻¹). Los resultados se muestran como el porcentaje de células viables a las 24 horas de la incubación con las NPs.

5.1.1.4. Terapia fototérmica con NPs de LaF₃:Nd³⁺ en un modelo murino de tumor

Con los resultados descritos en los apartados anteriores, podemos ver que las NPs de LaF₃:Nd³⁺ podrían ser unos excelentes agentes multifuncionales para terapia fototérmica controlada. Al actuar como termómetros ratiométricos, como hemos indicado anteriormente, permiten una medida absoluta de la temperatura totalmente independiente de fluctuaciones en la concentración de NPs o potencia de excitación láser. Para poder monitorizar la temperatura intratumoral durante el tratamiento, seguimos el procedimiento experimental descrito en la sección 3.5.3.1, con una cámara CCD para recoger la señal de emisión de las NPs después de que esta sea analizada espectralmente por un monocromador. Esto nos permite obtener en tiempo real el ratio entre los dos picos de emisión que nos interesa y, por tanto, la temperatura intratumoral en cada momento.

Los objetivos de este experimento eran tres: comprobar que era posible medir la temperatura intratumoral en tiempo real durante el proceso de terapia fototérmica, evaluar la diferencia entre esta temperatura y la superficial (medida a través de termografía infrarroja) y, por último comprobar que se podían eliminar tumores de forma efectiva con estas NPs. Para ello, se utilizaron seis ratones atímicos desnudos en

los que se indujeron dos tumores (uno por flanco) como se explica en detalle en la sección 3.5.3.1. En la primera parte de estos experimentos, tres de los ratones fueron inoculados en uno de los tumores por inyección intratumoral con NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$ (dispersadas en PBS a una concentración de $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). El volumen inoculado en cada caso correspondió a la mitad del volumen del tumor a tratar. Posteriormente, recibieron fototérmica completa en este tumor bajo idénticas condiciones de tratamiento, consistentes en una irradiación de 4 minutos de duración con un láser de 808 nm a una densidad de potencia de $4 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$. La elección de estos valores de potencia y concentración de NPs para el tratamiento se basó en el trabajo previo realizado por Rocha *et al.* sobre el efecto fototérmico *ex vivo* de las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$. [Rocha 2014]

Los tres tumores no tratados (uno en cada ratón) fueron utilizados como controles para tres situaciones diferentes: 1.- inyectados con NPs pero no irradiados (control NPs); 2.- sometidos a una irradiación en las mismas condiciones después de una inyección intratumoral de PBS (PBS + láser) o 3.- no sometidos a ningún tipo de intervención (control total). Dado que las temperaturas alcanzadas durante el primer tratamiento estaban en el rango deseado para realizar terapia térmica, de acuerdo con lo expuesto en el capítulo 1, se decidió mantener este conjunto de parámetros para el resto de casos. Los tres ratones restantes fueron utilizados en la segunda parte de los experimentos para recibir terapia térmica completa en los dos tumores.

En la **Figura 5.4 (a)** se presenta la evolución temporal de la temperatura intratumoral, medida a través de la fluorescencia de las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$, y la de la superficie corporal del animal, medida a través de termografía infrarroja, durante la terapia fototérmica llevada a cabo en este trabajo. Podemos ver claramente que, si bien ambas temperaturas aumentan siguiendo la misma tendencia, la temperatura superficial es en todo momento inferior a la intratumoral. Al final del tratamiento, como se puede ver en la gráfica, el incremento de temperatura superficial ($\Delta T_{\text{sup}}^{\text{max}} \approx 17^\circ\text{C}$) es, aproximadamente, un 20 % inferior al intratumoral ($\Delta T_{\text{tumor}}^{\text{max}} \approx 20.2^\circ\text{C}$). En esta figura se muestra también la evolución temporal de la temperatura superficial en el caso de

control PBS + láser. Se puede observar en esta gráfica que la temperatura superficial medida en el caso de control PBS + láser es muy inferior en todo momento a la registrada en el tumor tratado, de forma que el láser por sí mismo no produce incrementos de temperatura suficientemente elevados para afectar al crecimiento del tumor. Esto se puede comprobar observando la evolución del tamaño de los tumores después del tratamiento, que se muestra en detalle en la **Figura 5.4 (b)** para los ratones correspondientes a la primera parte del experimento, es decir, aquellos que fueron utilizados simultáneamente para tratamiento y control. En la mitad superior de la figura se representan los datos correspondientes al ratón que recibió el tratamiento completo en uno de los tumores e inyección de NPs sin irradiar en el otro, mientras que los de la mitad inferior corresponden al ratón cuyo tumor control fue irradiado tras ser inyectado con PBS. Podemos observar una evolución satisfactoria de los tumores tratados con NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$ y láser en ambos casos, llegando a desaparecer completamente a los 10 días después de la aplicar terapia. En la **Figura 5.4 (c)** se muestran las imágenes ópticas obtenidas a distintos tiempos del experimento para el ratón que recibió terapia fototérmica completa en uno de los tumores y PBS + láser en el otro. Podemos ver que inmediatamente después del tratamiento (*Día 0*) apareció una quemadura superficial en la piel del animal sobre el tumor tratado, que con el paso de los días dio lugar a una úlcera (*Día 7*). La evolución favorable de esta dio paso a una cicatriz superficial 20 días después del tratamiento, tal y como se puede observar en la **Figura 5.4 (c)**. Estos resultados favorables se repitieron para los tres ratones cuyos tumores recibieron terapia fototérmica completa en la segunda parte del experimento.

Respecto a la evolución de los tumores control, en la **Figura 5.4 (b)** podemos observar que el tamaño de los mismos no se redujo drásticamente después de la intervención como en el caso de los tumores tratados. No obstante, el tumor control PBS + láser experimentó una clara reducción en su tamaño en la segunda semana después de ser irradiado, de forma que su tamaño quince días después era prácticamente idéntico al que presentaba en el momento de la intervención. Esto nos indica que probablemente, la densidad de potencia láser utilizada es suficientemente elevada para producir algún tipo de daño en el tumor. No obstante, debido al número

extremadamente limitado de ratones utilizado ($n = 1$ para cada condición control), no es posible extraer con total certeza esta conclusión, ya que el crecimiento del tumor podría haberse detenido por causas no relacionadas con el experimento.

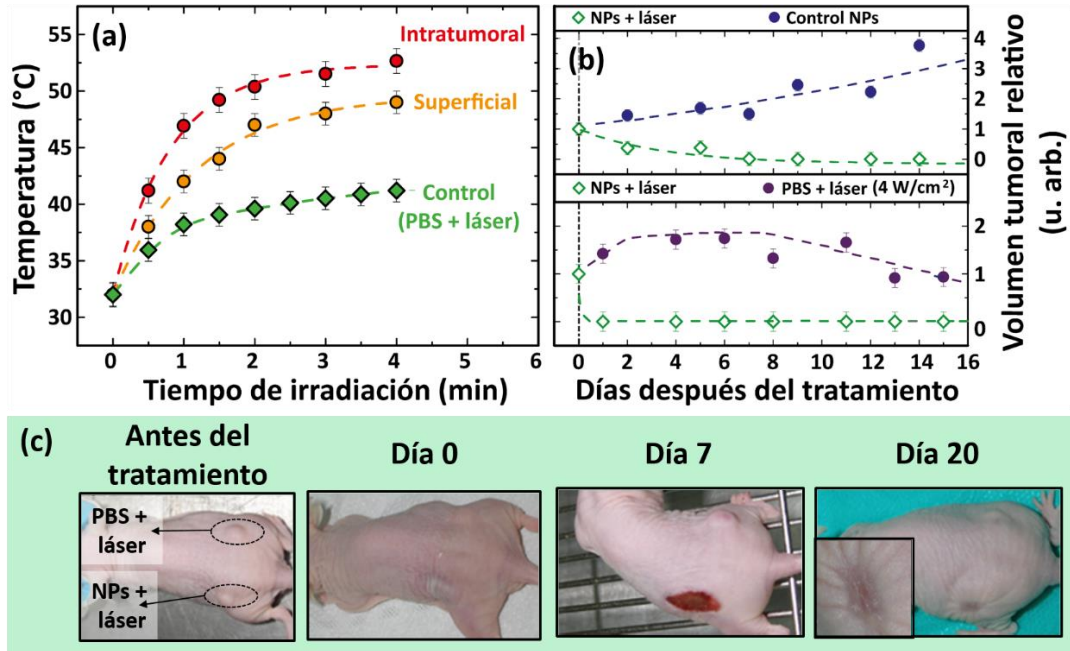


Figura 5.4. Terapia fototérmica con NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$: monitorización de la temperatura y evolución de los tumores. (a) Incremento de temperatura en función del tiempo de tratamiento medido en el interior del tumor (a través de la fluorescencia de las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$) y en la superficie corporal del animal (a través de termografía infrarroja). Se muestran también los datos correspondientes a la temperatura superficial obtenida para el control láser. (b) Evolución temporal del volumen promedio de los tumores del ratón en el que uno de los tumores recibió tratamiento completo y el otro fue utilizado como control PBS + láser (gráfica superior) y ratón en el que uno de los tumores recibió tratamiento completo y el otro fue utilizado como control de inyección de NPs sin irradiación. La línea discontinua vertical indica el día del tratamiento. En todos los casos, los símbolos corresponden a datos experimentales y las líneas discontinuas actúan de guía visual. (c) Imágenes correspondientes a distintos momentos del tratamiento de un ratón que recibió terapia fototérmica completa en uno de los tumores y PBS + láser en el otro. A los 20 días sólo queda una cicatriz superficial en el lugar del tumor tratado, que se muestra ampliada en la imagen.

Como comentamos anteriormente, el objetivo de este trabajo no era hacer un estudio estadístico de la efectividad de estas NPs como agentes terapéuticos sino demostrar como prueba de concepto la posibilidad de monitorizar en tiempo real la temperatura intratumoral a través de cambios espectrales en la emisión de las NPs

utilizadas como agentes fototérmicos. Estos objetivos han sido satisfechos y los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de utilizar métodos de control de temperatura en tiempo real adicionales a la termografía infrarroja, ya que ésta sólo nos indica la temperatura en superficie corporal del individuo y ésta no se corresponde con la temperatura en el interior del tumor tratado. No obstante, sería deseable encontrar un sistema capaz de producir incrementos de temperatura del mismo orden utilizando densidades de potencia de excitación más bajas, de forma que se minimice el calentamiento de los tejidos sanos y se optimice la eficiencia del tratamiento.

5.1.2. Nanopartículas de NdVO_4

5.1.2.1. *NPs de NdVO_4 vs. $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ como agentes fototérmicos*

Con este objetivo y teniendo en cuenta los resultados presentados en la sección anterior, donde vimos que un mayor nivel de dopaje con iones Nd^{3+} se traducía en un mayor calentamiento, procedimos a estudiar el caso de un sistema en el que los iones Nd^{3+} formasen parte de la propia matriz cristalina. Las NPs ultrapequeñas de NdVO_4 , cuya síntesis se describe en la sección 3.6.2.4, fueron elegidas para este fin debido a que presentan dos características especialmente interesantes para llevar a cabo terapia fototérmica. En primer lugar, el pequeño diámetro que presentan estas NPs (≈ 2.4 nm), hace que su relación superficie/volumen sea cinco veces superior a la de las NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ (≈ 12 nm de diámetro promedio). Una mayor relación superficie/volumen se traduce en una mayor presencia de defectos superficiales, que resultan en un aumento de los procesos de desexcitación no radiativa así como en una transferencia más eficiente del calor al medio en el que las NPs se encuentran dispersas; haciendo previsible una mayor eficiencia de conversión fototérmica. Adicionalmente, las NPs de NdVO_4 presentan una posición óptima del máximo de excitación, como se puede ver en los espectros representados en la **Figura 5.5 (a)**. Mientras que el máximo de excitación para las NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ se sitúa por debajo de 790 nm, lo que resulta en una absorción subóptima de la radiación de 808 nm utilizada como fuente de excitación, éste está centrado en 808 nm en el caso de las NPs de NdVO_4 . Debido al mayor contenido de Nd^{3+} , la fluorescencia de estas NPs no es suficientemente intensa como para poder determinar con suficiente precisión la temperatura en un tejido biológico de forma que

no es posible llevar a cabo terapia fototérmica con control de la temperatura intratumoral. No obstante, debido a las características mencionadas anteriormente, decidimos explorar su potencial como agentes terapéuticos en terapia fototérmica.

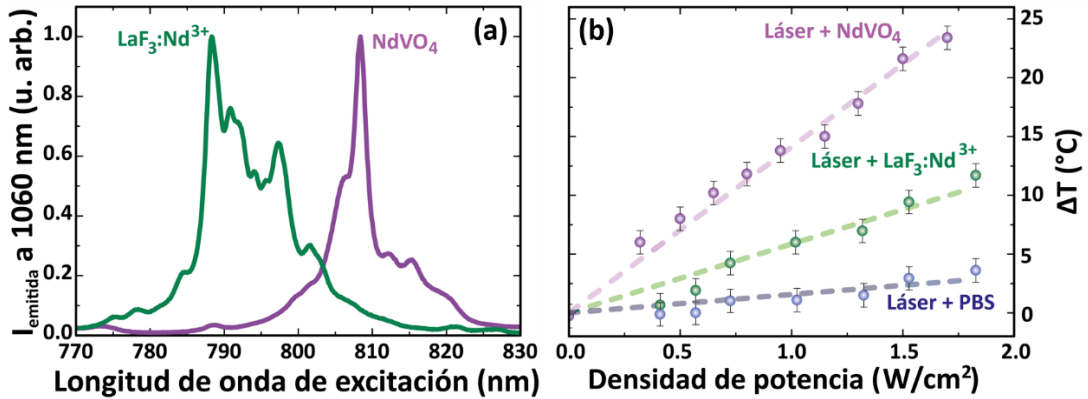


Figura 5.5. Comparación de propiedades espectroscópicas y fototérmicas e NPs de NdVO_4 y $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$. (a) Espectros de excitación en el rango 700-830 nm correspondientes a dispersiones acuosas de ambos tipos de NPs. (b) Calentamiento *ex vivo* observado en una muestra de tejido muscular inyectada con cada uno de los tipos de NPs e irradiada con un láser de 808 nm en las mismas condiciones experimentales. El caso control, correspondiente a una muestra inyectada con una cantidad equivalente de PBS, se incluye por comparación. Los datos correspondientes a la muestra de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ han sido extraídos del trabajo de Rocha *et al.* [Rocha 2014]

En primer lugar, comprobamos si el incremento de temperatura generado por estas NPs era, como suponíamos, superior al obtenido con las NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ a través de un experimento *ex vivo*. Para ello, comparamos la temperatura superficial bajo irradiación láser en una muestra de tejido muscular de pollo inyectado con NPs de NdVO_4 (a una profundidad de aproximadamente 2 mm) y comparamos los valores obtenidos por Rocha *et al.* para las NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ en las mismas condiciones. Los resultados de este experimento se muestran en la **Figura 5.5 (b)**, donde podemos observar que el incremento de temperatura aumenta linealmente con la densidad de potencia láser, con una pendiente superior en el caso de las NPs de NdVO_4 , siendo ésta más de dos veces superior a la de las NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$ ($12\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{W}^{-1}$ frente a $4.5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{W}^{-1}$).

Además de llevar a cabo esta comparación con las NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$, para las NPs de NdVO_4 también se determinó su eficiencia de conversión fototérmica, η . Este parámetro se corresponde con la fracción de la energía absorbida por las NPs a una longitud de onda concreta (en este caso, de 808 nm) que se transforma en calor. Para ello, se utilizó el método presentado por Roper *et al.*, que nos permite obtener η estudiando el calentamiento inducido por láser (y el enfriamiento subsiguiente) de una dispersión de NPs de concentración y densidad óptica conocidas. En este caso, utilizamos una cubeta de cuarzo abierta en la que se depositó la dispersión de NPs (500 μL a una concentración de $100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, densidad óptica de 1.9) sobre la que se hizo incidir radiación láser de 808 nm (403 mW de potencia). Mediante termografía infrarroja se monitorizó la temperatura de la dispersión durante la irradiación, de forma que una vez alcanzado un valor estable, se procedió a apagar el láser y monitorizar también la temperatura de la dispersión durante el enfriamiento. De esta forma, pudimos obtener los parámetros necesarios para determinar la eficiencia de conversión fototérmica, que viene dada por la siguiente expresión:

$$\eta = \frac{hA(T_{\max} - T_0) - Q_0}{I(1 - 10^{-OD})} \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

donde h es el coeficiente de transferencia de calor y A , el área superficial de la cubeta que contiene la dispersión. T_{\max} y T_0 representan la temperatura máxima alcanzada por la dispersión y la temperatura ambiente, respectivamente. Q_0 corresponde al calor disipado por el medio en el que están dispersados los QDs y la cubeta, mientras que I representa la potencia del láser y OD la densidad óptica de la muestra a la longitud de onda de irradiación. Como se explica en la bibliografía, hA puede calcularse a partir de la constante de tiempo del sistema, τ_s , que a su vez se puede determinar a partir del ajuste exponencial de la curva de enfriamiento utilizando la siguiente expresión:

$$hA = \frac{m_D C_D}{\tau_s} \quad (\text{Ecuación 5.3})$$

donde m_D y C_D corresponden a la masa y calor específico del medio en el que están dispersas las NPs, agua en este caso. Sustituyendo $m_D = 0.5 \text{ g}$ and $C_D = 4.179 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$, así

como el tiempo característico del sistema obtenido a partir de la curva de enfriamiento ($\tau_s = 142 \pm 7$ s), obtenemos un valor de $hA = 14.4 \pm 0.7$ mW·K⁻¹.

El incremento máximo de temperatura, $T_{\max} - T_0$, es de 21.9 ± 0.5 °C para la potencia láser utilizada (403 mW). Para determinar Q_0 , realizamos el mismo procedimiento bajo idénticas condiciones con una cubeta que contenía únicamente agua; y obtuvimos un valor de 38.2 mW. Sustituyendo estos valores en la **Ecuación 5.2**, obtenemos una eficiencia de conversión fototérmica del $72 \pm 5\%$ para las NPs de NdVO₄. Este valor es inferior al que presentan las nanoestructuras metálicas, que llegan a superar el 90 %, pero es comparable al de otros materiales propuestos como agentes fototérmicos, incluyendo las NPs de grafeno, que han sido utilizadas con éxito para terapia fototérmica *in vivo*. [Chen 2010, Yang 2010, Chen 2012, Li 2014, Savchuk 2016]

5.1.2.2. Toxicidad a nivel celular de las NPs de NdVO₄.

Al igual que hicimos en el caso anterior, antes de plantear la aplicación *in vivo* de las NPs de NdVO₄, evaluamos su toxicidad *in vitro* en una línea celular. En este caso, las células HeLa se incubaron con distintas concentraciones de NPs (entre 100 y 500 µg·mL⁻¹) dispersas en TBS y se analizó su viabilidad para dos tiempos de incubación (2 y 6 horas). Estos experimentos arrojan resultados dispares, como se puede ver en la **Figura 5.6**. Mientras que para el tiempo de incubación más largo la viabilidad celular se mantiene entre un 90 y un 100% para todas las concentraciones utilizadas, para el tiempo de incubación inferior se observa una cierta proliferación celular. No obstante, debido a la ausencia de una toxicidad clara, decidimos llevar a cabo experimentos de terapia fototérmica *in vivo* para evaluar las capacidades de estas NPs como agentes terapéuticos.

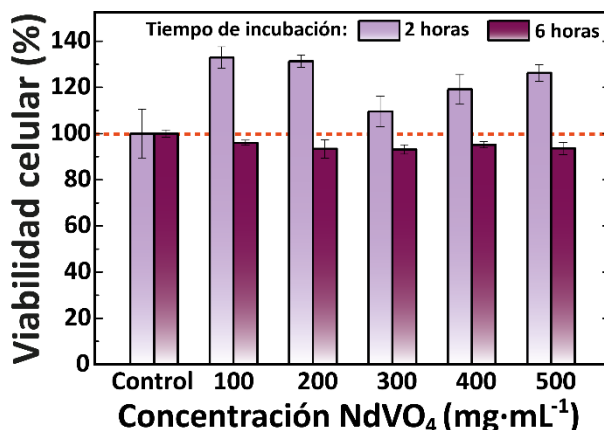


Figura 5.6. Toxicidad in vitro de las NPs de NdVO_4 . Resultados de los experimentos de toxicidad en la línea celular HeLa para distintas concentraciones de NPs (100, 200, 300, 400 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y dos tiempos de incubación (2 y 6h). Los resultados se muestran como el porcentaje de células viables a las 24 horas de la incubación.

5.1.2.3. Nanopartículas de NdVO_4 como agentes fototérmicos in vivo

Como último experimento previo a la aplicación de estas NPs en terapia fototérmica en un modelo animal, nos planteamos medir el incremento de temperatura *in vivo* para una dosis de NPs (dispersadas a una concentración de 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en TBS) inyectadas subcutáneamente en un ratón CD1. El objetivo de este experimento era determinar de la forma más precisa posible la densidad de potencia láser que era necesario utilizar para obtener incrementos de temperatura adecuados para terapia fototérmica. En dicho experimento, determinamos que para densidades de potencia entre 0.6 y 0.8 $\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ se alcanza una temperatura superficial en el área de la inoculación cercana a los 55 °C, que, de acuerdo con los resultados presentados en la **Figura 5.4**, es suficiente para llevar a cabo terapia fototérmica satisfactoriamente.

Basándonos en estos resultados, procedimos a evaluar la capacidad de las NPs de NdVO_4 como agentes fototérmicos en un modelo murino de tumor. Para ello, utilizamos cinco ratones atímicos (inmunodeprimidos), en los que se generó un tumor en cada flanco siguiendo el proceso detallado en la sección 3.5.3.2. Es importante comentar en este punto que en esta ocasión se utilizó la línea celular A431, más tumorogénica para optimizar el crecimiento de los tumores. La línea celular MDA-MB-231 utilizada en la sección anterior produjo tumores cuyo crecimiento fue muy poco homogéneo,

produciendo incluso tumores que no llegaron a alcanzar un volumen suficiente para ser utilizados en estos ensayos.

Cada uno de los ratones estudiados en este caso recibió terapia fototérmica completa en uno de los tumores mientras que el otro fue utilizado para alguna de las condiciones control. Para el tratamiento, los ratones fueron inoculados por vía intratumoral con una dispersión de NPs de NdVO_4 ($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en TBS). Al igual que en el caso de las NPs de $\text{LaF}_3\text{:Nd}^{3+}$, el volumen inoculado correspondió a la mitad del volumen del tumor. Durante todos los tratamientos, la temperatura superficial de los ratones fue monitorizada mediante termografía infrarroja, al igual que en los casos de control TBS + láser (irradiados tras una inyección de TBS sin NPs), la temperatura superficial fue monitorizada mediante termografía infrarroja. En cuanto a las condiciones de tratamiento, tres de los tumores recibieron terapia a densidad de potencia láser de $0.8 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$, mientras que los dos restantes recibieron una densidad de potencia menor ($0.6 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$). Uno de los tumores tratados a $0.8 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ se descartó para el análisis posterior debido a la dificultad para realizar la inyección de NPs que resultó en una pérdida de muestra y en una localización muy ladeada de las NPs. La temperatura superficial promedio en función del tiempo de tratamiento se muestra para ambas densidades de potencia junto con la medida para los casos de control láser en las **Figura 5.7 (a) y (b)**. Podemos ver que la temperatura superficial rebasó los 55°C en los tumores irradiados con mayor densidad de potencia, mientras que los tratados con la densidad de potencia más baja alcanzaron los 50°C al final del tratamiento.

Durante los doce días posteriores al tratamiento se monitorizó la evolución del volumen tumoral, como se muestra en la **Figura 5.8**. En la **Figura 5.8 (a)** se muestran los resultados obtenidos para cuatro de los tumores tratados (uno de los ratones tratados a menor densidad de potencia tuvo que ser sacrificado antes de la conclusión del experimento y por tanto, sus datos no aparecen representados en esta figura). Podemos apreciar que el tratamiento fue efectivo en tres de los casos, que se corresponden con aquellos en los que el incremento de temperatura superficial alcanzó al menos 50°C . El último caso se corresponde con el tratamiento que se descartó para

el análisis térmico debido a los problemas que surgieron en la inoculación de las NPs. En este animal se obtuvieron incrementos de temperatura muy similares a los del control, lo que no permitió alcanzar el objetivo terapéutico deseado.

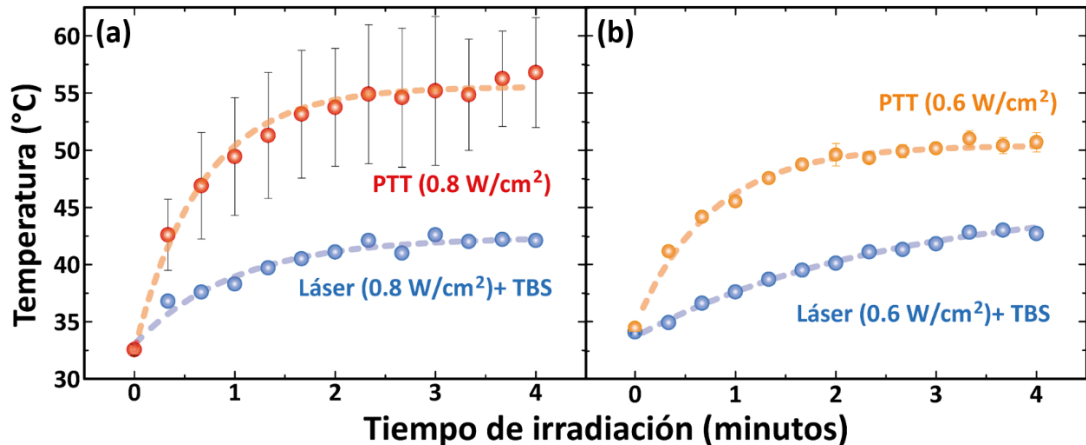


Figura 5.7. Terapia fototérmica con NPs de NdVO_4 : monitorización de temperatura. Temperatura superficial promedio durante los cuatro minutos de tratamiento (a) para los ratones irradiados con $0.8 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ y (b) para los irradiados con $0.6 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$. En ambos casos, se incluyen las temperaturas superficiales de los casos control TBS + láser. Los puntos corresponden a los datos experimentales, mientras que las líneas discontinuas se muestran como guías para los ojos.

En la **Figura 5.8 (b)** podemos ver la evolución del tamaño de los cuatro tumores control: control total, control TBS + láser (irradiación a 0.6 y $0.8 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ tras una inyección intratumoral de TBS) y control de NPs sin irradiación posterior. Mientras que no existe ningún efecto terapéutico debido exclusivamente a la radiación láser a estas densidades de potencia, sí se aprecia un claro efecto en el caso de la inoculación de NPs sin irradiación con láser. Las NPs, por sí mismas, causaron una clara reducción del volumen tumoral. En la **Figura 5.8 (b)** podemos apreciar claramente que doce días después de la inyección de NPs, el tumor prácticamente ha desaparecido sin necesidad de irradiación láser. Se pudo observar, además, que en los días siguientes a la inoculación intratumoral de las NPs se generó una lesión superficial con apariencia de quemadura muy similar a la que presentaban en este punto del experimento los ratones que recibieron terapia fototérmica completa, como se muestra en la **Figura 5.8 (c)**. En esta figura aparecen las imágenes de algunos de los tumores estudiados en este

experimento obtenidas tres días después de la intervención. Podemos ver que, mientras que los tumores correspondientes a los casos de control láser no mostraban ninguna evidencia de haber sido afectados por el procedimiento, tanto los tumores tratados con terapia completa así como los dos utilizados como control inoculados con NPs pero sin irradiación láser presentaban una evidente quemadura superficial.

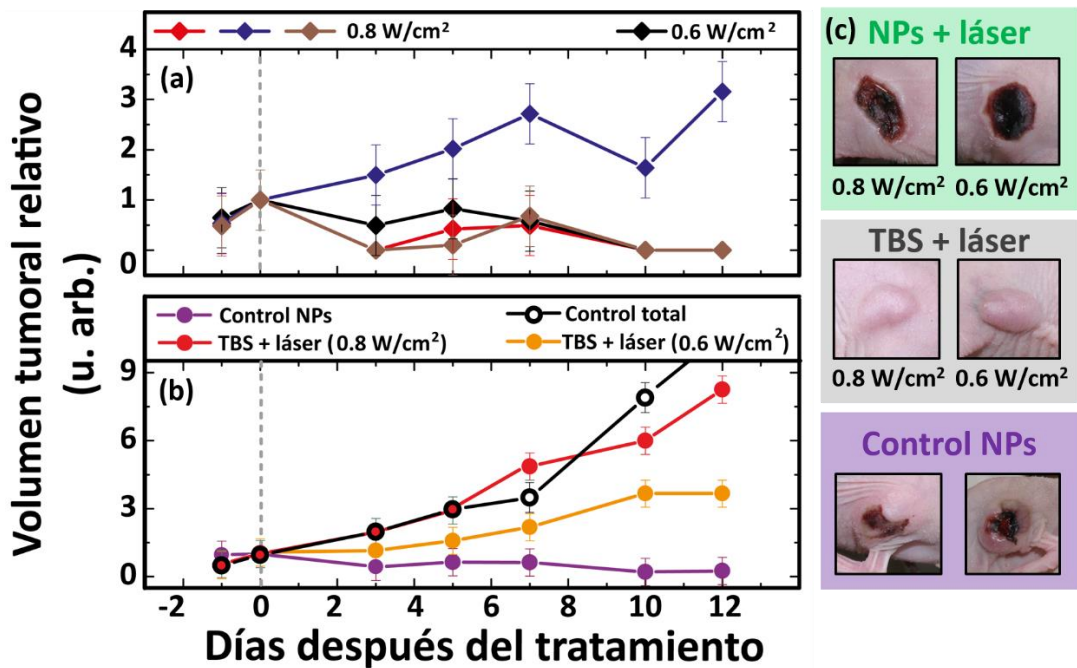


Figura 5.8. Evolución del volumen tumoral tras la terapia fototérmica. (a) Volumen de los tumores tratados con NPs de NdVO_4 a $0.8 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (tres ratones) y $0.6 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ (un ratón) y (b) de los distintos casos control normalizados al valor que presentaban el día de la intervención, indicado por una línea discontinua. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas actúan como guía visual.

El hecho de que los efectos observados en el caso de control de NPs sin irradiación sean muy similares a los del tratamiento completo es un claro indicativo de la necesidad de llevar a cabo un estudio en profundidad sobre la biocompatibilidad de estos materiales. A la conclusión de esta tesis doctoral, aún queda pendiente una exploración exhaustiva de la toxicidad de estas NPs tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* que nos permita determinar con seguridad las causas de estos efectos de las NPs sobre los tumores. Existen en la literatura evidencias de actividad fotocatalítica en

ausencia de fotoexcitación para nanohilos de NdVO_4 , [Xu 2011] lo que en este caso resultaría en la producción de radicales libres que podrían ser responsables de los efectos observados en los tumores. [Dreher 1996]

En cualquier caso, estos resultados nos indican la necesidad de ser especialmente cuidadosos a la hora de evaluar los posibles efectos tóxicos de cualquier tipo de NPs antes de plantear su uso en modelos animales.

5.2. Terapia fototérmica controlada mediante QDs

Las NPs utilizadas en este apartado, QDs de PbS/CdS/ZnS cuya caracterización y uso para imagen de fluorescencia de alto contraste en modelos animales ya se ha descrito en capítulos anteriores, nos permiten obtener gracias a su intensa luminiscencia en la segunda ventana biológica imágenes *in vivo* incluso a muy bajas concentraciones y densidades de potencia de excitación. Además, estos QDs también resultan interesantes como agentes fototérmicos debido la presencia de procesos de desexcitación no radiativa, en los que se genera calor. La característica que convierte a estos QDs en un material de auténtico interés para terapia fototérmica es que la intensidad de su banda de emisión es altamente sensible a la temperatura. Monitorizando la fluorescencia de los QDs durante el tratamiento, es posible obtener una lectura en tiempo real del incremento de temperatura en el volumen en el que éstos se encuentran distribuidos. En este caso, antes de aplicar los QDs en un modelo animal de tumor, se ha llevado a cabo un estudio mucho más amplio que en el caso de las NPs descritas en la sección 4.1 para así evitar, en la medida de lo posible, efectos adversos inesperados. En el caso de los QDs de PbS/CdS/ZnS , debido a la toxicidad que implicaría cualquier filtración al organismo de los metales pesados de las capas internas, era esencial comprobar que su estabilidad estructural no se veía comprometida durante procesos de calentamiento como los que se llevan a cabo en terapia fototérmica.

5.2.1. QDs de PbS/CdS/ZnS como nanotermómetros fluorescentes

En la **Figura 5.9 (a)** podemos observar el espectro de emisión de una dispersión acuosa de QDs de PbS/CdS/ZnS obtenida bajo excitación con un láser de 808 nm a distintas temperaturas. Se puede apreciar una clara disminución de la intensidad de la

banda de emisión al aumentar la temperatura. Este fenómeno es totalmente reversible, de forma que a través de sucesivas rampas de calentamiento y enfriamiento, pudimos obtener la curva de calibración que se muestra en la **Figura 5.9 (b)**, donde aparece representada la intensidad de emisión (normalizada por su valor a 20 °C) en función de la temperatura.

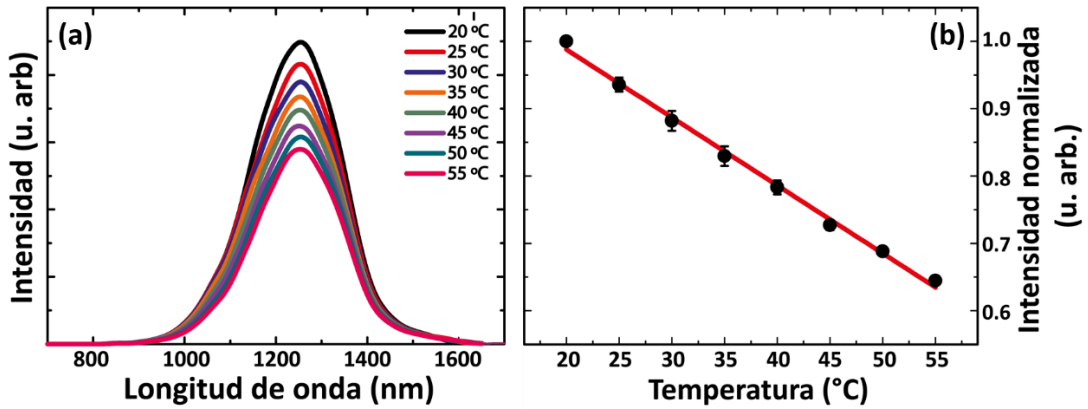


Figura 5.9. Sensibilidad de los QDs a la temperatura. (a) Espectro de emisión de los QDs de PbS/CdS/ZnS a diferentes temperaturas utilizando un láser de 808 nm como fuente de excitación. (b) Curva de calibración correspondiente a la intensidad de emisión, normalizada por su valor a 20 °C, obtenida a partir de los espectros mostrados en (a). Los puntos se corresponden con los datos experimentales, mientras que la línea indica el mejor ajuste de dichos puntos a una recta.

A partir de la pendiente de esta curva de calibración podemos determinar su sensibilidad térmica, que se define como:

$$S_I = \frac{1}{I} \frac{dI}{dT} \quad (\text{Ecuación 5.4})$$

donde I representa la intensidad y T , la temperatura. Los datos experimentales obtenidos para los QDs de PbS/CdS/ZnS nos indican que estos poseen una sensibilidad térmica del $1.00 \pm 0.04 \% \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$ a 20 °C. A fecha de realización de esta tesis doctoral, este valor de sensibilidad térmica constituye el más alto obtenido hasta el momento para un nanotermómetro no híbrido capaz de operar en la segunda ventana biológica.

5.2.2. QDs de PbS/CdS/ZnS como agentes fototérmicos

Utilizando el mismo procedimiento que seguimos para las NPs de NdVO_4 descritas en la sección anterior, calculamos la eficiencia de conversión fototérmica de los QDs de PbS/CdS/ZnS, obteniendo un resultado del $43 \pm 4 \%$.

Este valor es inferior al que presentan algunas nanopartículas que como mencionamos en el apartado anterior, pueden superar el 90 %. Este valor también es inferior al que presentan las NPs de NdVO_4 descritas en el apartado 5.1.2, lo que nos indica que necesitaremos aplicar densidades de potencia de excitación superiores para alcanzar incrementos de temperatura similares en los experimentos de terapia fototérmica. No obstante, la combinación de propiedades que presentan estos QDs, destacando su capacidad para proporcionar imágenes de alto contraste en la segunda ventana biológica, sus buenos resultados en ensayos de toxicidad *in vitro* e *in vivo* y, sobre todo, su elevada sensibilidad térmica, hacen que el estudio de los QDs de PbS/CdS/ZnS como agentes fototérmicos para terapia térmica con control de temperatura resulte extremadamente interesante.

La capacidad calentadora de los QDs de PbS/CdS/ZnS fue comprobada también a través de experimentos *ex vivo*. Para ello, medimos la temperatura superficial máxima (obtenida mediante termografía infrarroja) de una muestra de tejido muscular inyectada con 100 μL de QDs en PBS ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a una profundidad de aproximadamente 1 mm en función de la densidad de potencia de irradiación. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 5.10**, en la que también se representan las temperaturas superficiales máximas para una muestra inyectada con la misma cantidad de PBS sin QDs. Como podemos ver, para la máxima densidad de potencia láser ($3 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$), la temperatura superficial experimenta un incremento próximo a los 25°C en la muestra inyectada con QDs, mientras que en la inyectada únicamente con PBS, este incremento no supera los 2°C .

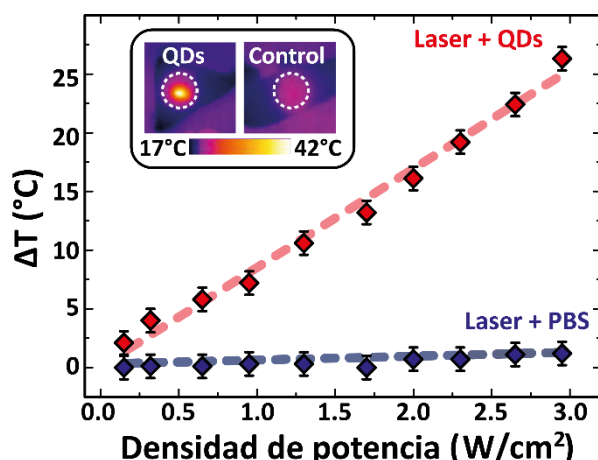


Figura 5.10. Conversión fototérmica de QDs de PbS/CdS/ZnS. Incrementos de temperatura máximos en función de la densidad de potencia láser (808 nm) para muestras de tejido muscular inyectadas con una dispersión de QDs en PBS y con PBS puro. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas discontinuas actúan como guía visual. Las imágenes termográficas correspondientes a ambas muestras para una densidad de potencia de $3 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ se muestran como *inset*.

5.2.3. Estabilidad de los QDs al calentamiento

Una vez determinada la capacidad calentadora de los QDs de PbS/CdS/ZnS, procedimos a la evaluación de su estabilidad fisicoquímica al calentamiento. Para ello, se sometió a una dispersión de QDs en PBS a una serie de cinco ciclos de calentamiento en los cuales la dispersión se mantuvo a una temperatura de 80°C durante 4 minutos. Este tiempo de calentamiento fue elegido por similitud con las condiciones que pretendíamos utilizar durante los tratamientos de terapia fototérmica en modelos murinos, ya que si se alcanzan temperaturas en el rango de ablación térmica (superiores a 50°C), un tiempo de tratamiento de 4 minutos es suficiente para destruir de manera efectiva los tumores tratados. Después de cada ciclo de calentamiento se estudió el espectro de emisión de la muestra bajo excitación con 808 nm, en busca de posibles cambios espectrales que indicasen algún tipo de alteración estructural en los QDs como resultado del calentamiento. Como se puede ver en la **Figura 5.11 (a)**, no existen diferencias entre los espectros de emisión obtenidos antes y después de cinco ciclos de calentamiento, con lo que podemos determinar que las propiedades de los

QDs de PbS/CdS/ZnS no se ven alteradas tras ser sometidas a varios ciclos de calentamiento hasta 80 °C.

No obstante, para comprobar que el calentamiento no resultaba en una filtración al exterior de los metales pesados que componen de las capas internas de los QDs, se procedió a evaluar la toxicidad celular *in vitro* de la muestra de QDs a una concentración de $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ sometida a los ciclos de calentamiento descritos en el párrafo anterior. En el mismo experimento se evaluó también la toxicidad de los QDs sin someter a calentamiento, para poder comparar con total fiabilidad los resultados obtenidos con QDs de PbS/CdS/ZnS antes y después de repetidos ciclos de calentamiento. Los resultados del ensayo de toxicidad en células HeLa se muestran en la **Figura 5.11 (b)** para tiempos de incubación de hasta 8 horas. Podemos observar que no existen diferencias llamativas entre ambas muestras, lo que nos indica de nuevo que calentar la muestra hasta 80 °C durante hasta 5 ciclos de 4 minutos no ha producido una alteración en los QDs que resulte en una mayor toxicidad de éstos a nivel celular.

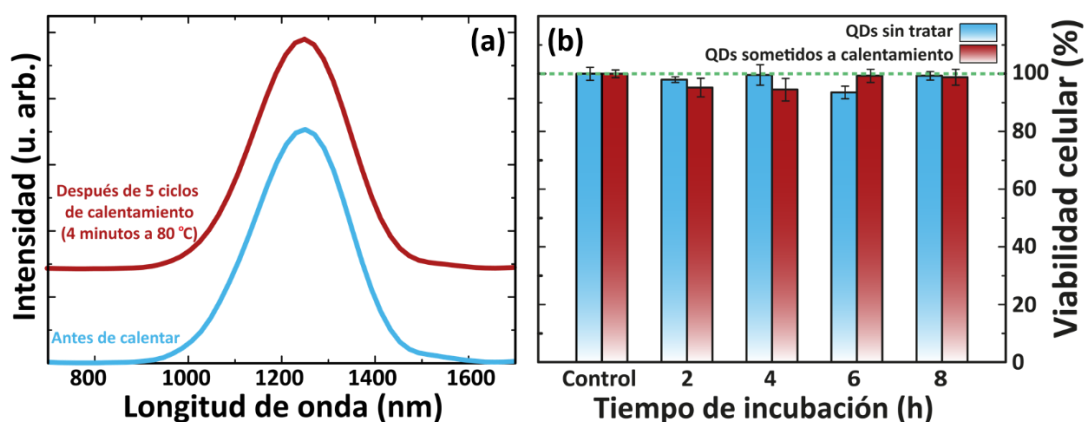


Figura 5.11. Estabilidad de los QDs de PbS/CdS/ZnS al calentamiento (a) Espectro de emisión (bajo excitación con láser de 808 nm) de una dispersión de QDs en PBS antes y después de ser sometida a 5 ciclos de calentamiento (4 minutos a 80 °C). **(b)** Resultados de los experimentos de toxicidad celular para distintos tiempos de incubación correspondientes a la muestra de QDs (concentrada a $0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en PBS) sometida a los ciclos de calentamiento descritos en (a) y a una muestra de QDs no calentada. Los resultados se muestran como el porcentaje de células que sigue siendo viable a las 24 horas de la incubación.

5.2.4. Simulación de terapia fototérmica con medida de temperatura en tiempo real

Por último, previamente a la realización de terapia fototérmica *in vivo* con QDs de PbS/CdS/ZnS, se procedió a evaluar *ex vivo* la respuesta de su sensibilidad a la temperatura a sucesivos ciclos de calentamiento. La intención de este experimento era comprobar que la intensidad de emisión de los QDs disminuía durante el proceso de irradiación con láser en respuesta al incremento de temperatura; y retornaba al mismo valor una vez la temperatura de la muestra había alcanzado de nuevo su valor inicial. Para ello, inyectamos nuevamente una muestra de tejido muscular de pollo con una dispersión de QDs de PbS/CdS/ZnS en PBS (50 μ L a concentración de 1 mg·mL⁻¹). Esta muestra fue sometida a dos ciclos de irradiación de 4 minutos de duración con láser de 808 nm a densidad de potencia elevada (2 W·cm⁻²), con el objetivo de simular tratamientos fototérmicos sucesivos. Antes del procedimiento, así como después de cada calentamiento fototérmico, la potencia del láser se redujo al mínimo valor posible (0.02 W·cm⁻²), que es suficiente para excitar la emisión de los QDs pero no para que éstos liberen calor de manera apreciable. De esta forma, pudimos monitorizar la fluorescencia de los QDs durante todo el proceso, observando que efectivamente la caída en la intensidad de emisión se debía a un incremento de temperatura y se recuperaba durante el enfriamiento, como se puede ver en la **Figura 5.12** Las oscilaciones en la intensidad de emisión que se aprecian en esta figura al finalizar cada ciclo de calentamiento se pueden atribuir a fluctuaciones en la potencia del diodo láser cuando la corriente que circula por él se reduce bruscamente hasta valores muy cercanos a su corriente umbral.

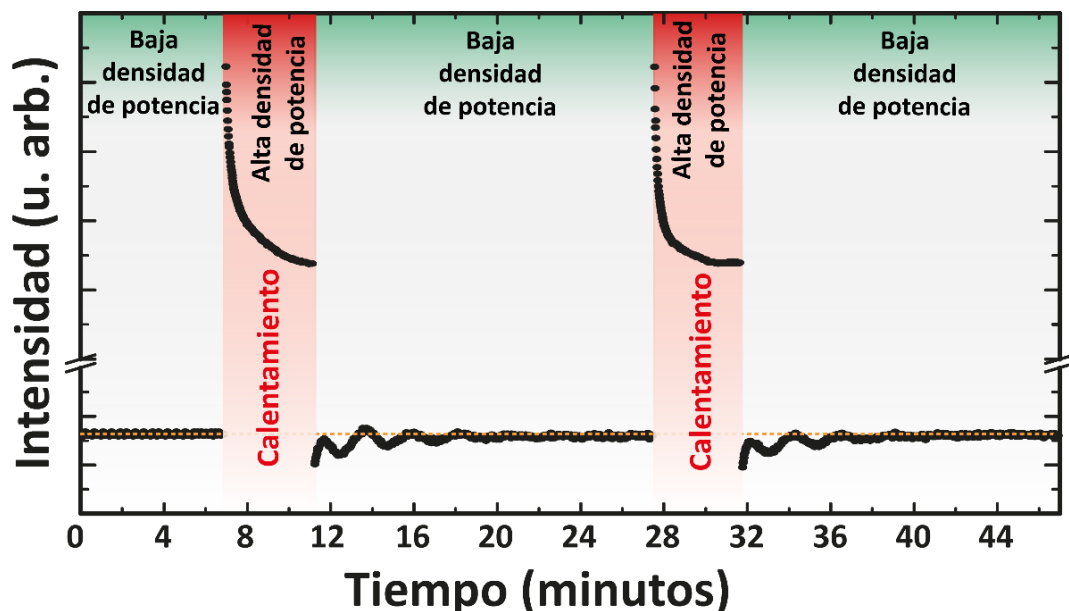


Figura 5.12. Simulación ex vivo de tratamiento fototérmico. Intensidad emitida por una muestra de QDs de PbS/CdS/ZnS inyectada en una muestra de tejido muscular durante dos procesos de calentamiento inducido por láser (808 nm, $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) de 4 minutos de duración, sombreados en rojo en la gráfica. Antes y después de cada uno de ellos, lo que corresponde a las zonas sombreadas en verde en la figura, se mantiene una muy baja densidad de potencia láser ($0.02 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) para seguir observando la emisión de los QDs.

5.2.5. Terapia fototérmica con QDs en un modelo murino de tumor

Teniendo en cuenta los resultados descritos en los apartados anteriores, podemos considerar que los QDs de PbS/CdS/ZnS presentan un elevado interés como agentes multifuncionales para terapia térmica controlada. Por ello, procedimos a evaluar sus posibles aplicaciones *in vivo*. Concretamente, analizamos la diferencia entre la temperatura de la superficie corporal (medida mediante termografía infrarroja) y la temperatura intratumoral (medida a través de la fluorescencia de los QDs) para distintas densidades de potencia de irradiación y estudiamos la evolución de los tumores después de la intervención. Para estos experimentos, se utilizaron 7 ratones atímicos desnudos, en los cuales se generaron tumores (uno en cada flanco) usando el procedimiento descrito en detalle en el capítulo 3 (ver sección 3.5.3.3). Cuando los tumores alcanzaron un volumen igual o superior a los 100 mm^3 , se procedió a su tratamiento. Tres de los ratones fueron inyectados por vía intratumoral con $60 \mu\text{L}$ de

una dispersión de QDs en PBS ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$); y sometidos a un tratamiento fototérmico siguiendo el procedimiento que se describe en la sección 3.5.3.3 con diferentes densidades de potencia láser (808 nm) en el rango $0.65\text{-}2.30 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$ durante 4 minutos. Los ratones restantes se utilizaron como controles, asignándose un tumor al caso de control total y otro a la inyección de QDs sin irradiación posterior (control QDs), mientras que el resto fueron empleados para evaluar el calentamiento producido a las distintas densidades de potencia por el láser sobre tumores en los que se había inyectado únicamente PBS en lugar de la dispersión de QDs (control PBS + láser).

Durante todos los tratamientos, como se explicó en detalle en el capítulo 3, la temperatura intratumoral se monitorizó de forma continua a través de la fluorescencia de los QDs, mientras que la temperatura superficial fue registrada simultáneamente con una cámara térmica. En las **Figura 5.13 (a) y (b)** podemos ver las imágenes termográficas y de fluorescencia correspondientes al principio y al final de un tratamiento fototérmico. El análisis en tiempo real de la fluorescencia de los QDs durante la irradiación nos proporcionó curvas como la mostrada en la **Figura 5.13 (c)**, donde se muestra la intensidad media del área donde se encuentran localizados los QDs en función del tiempo de exposición al láser de 808 nm a una potencia de $1.7 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$.

A partir de estos datos, utilizando la calibración que mostramos al principio de este capítulo, pudimos determinar el incremento de temperatura intratumoral y compararlo con el incremento de temperatura superficial. Es importante remarcar ahora que los QDs, al proporcionarnos una lectura de temperatura a través de cambios en su intensidad de emisión, no permiten obtener una medida absoluta de la temperatura, pero sí son adecuados para evaluar la variación de temperatura durante un proceso como el que proponemos aquí, en el que la emisión es monitorizada de manera continua.

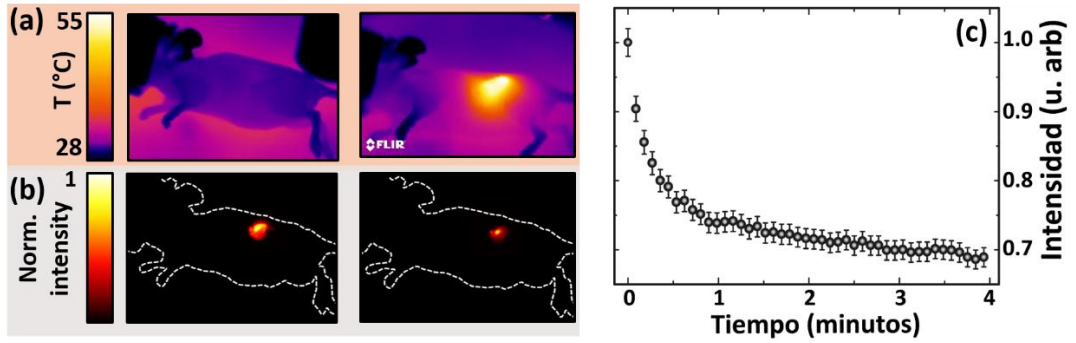


Figura 5.13. Imagen térmica y de fluorescencia durante terapia fototérmica in vivo. (a) Imágenes termográficas obtenidas al inicio y al final de un tratamiento fototérmico de 4 minutos de duración a $1.7 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$. (b) Imágenes de fluorescencia registradas al principio y al final del mismo tratamiento. (c) Intensidad de la emisión de los QDs de PbS/CdS/ZnS en función del tiempo de irradiación.

Las curvas correspondientes a los incrementos de temperatura intratumoral y superficial en función del tiempo se muestran en la **Figura 5.14 (a)** para el caso particular del tumor irradiado a $1.7 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$. Se puede observar que, si bien la tendencia asintótica de las curvas es la misma, la lectura de temperatura superficial proporcionada por la cámara térmica es marcadamente inferior a la indicada por los QDs en todo momento. El hecho de que los QDs, que actúan como foco del calentamiento, estén en el interior del tumor hacía previsible este resultado, ya que debido a la difusión térmica el valor de la temperatura superficial siempre será menor al de la temperatura intratumoral. La diferencia entre estas dos temperaturas resulta más significativa cuanto mayor es la densidad de potencia, como se muestra en la **Figura 5.14 (b)**, donde se representan los incrementos máximos de temperatura intratumoral (c) y superficial ($\Delta T_{\text{sup}}^{\text{max}}$) para todas las densidades de potencia utilizadas en este trabajo. Podemos observar que para densidades de potencia relativamente elevadas ($2.0 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$), la diferencia entre ambas temperaturas al final del tratamiento supera los $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Ajustando los datos presentados en esta figura a una recta, determinamos la relación entre las temperaturas máximas superficial e intratumoral, obteniendo que $\Delta T_{\text{sup}}^{\text{max}} = (0.67 \pm 0.04) \Delta T_{\text{tumor}}^{\text{max}}$.

En la **Figura 5.14 (b)** se muestran también las temperaturas superficiales obtenidas para los casos de control láser. Podemos ver que el calentamiento producido por el láser no es en absoluto despreciable, alcanzando un incremento de temperatura de 25 °C para la mayor densidad de potencia utilizada ($2.3 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$).

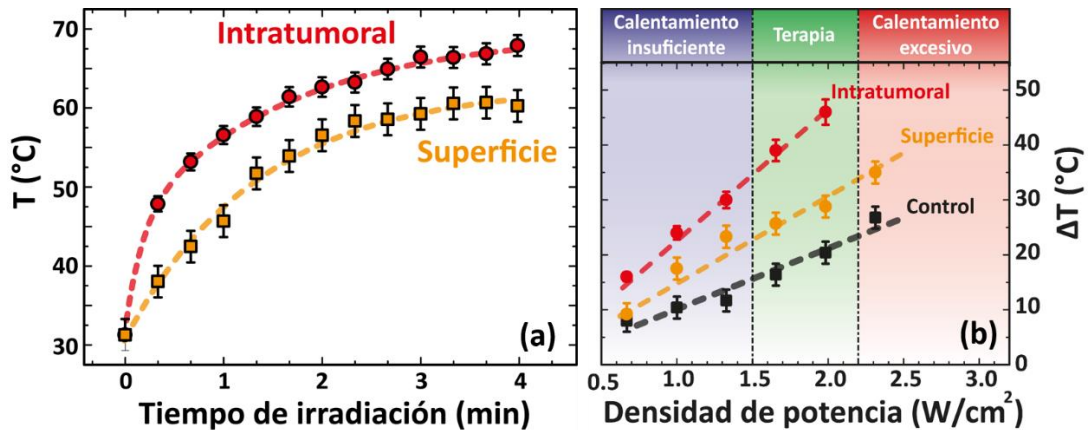


Figura 5.14. Terapia fototérmica in vivo con monitorización continua de la temperatura. (a) Temperatura intratumoral (obtenida a partir de la emisión de los QDs) y superficial (obtenida mediante imagen termográfica) durante un tratamiento fototérmico en el que se irradió durante 4 minutos un tumor inyectado con QDs de PbS/CdS/ZnS a una densidad de potencia de $1.7 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ con un láser de 808 nm. Las líneas discontinuas representan una guía visual. **(b)** Incrementos de temperatura intratumoral y superficial medidos al final de tratamientos fototérmicos a diferentes densidades de potencia. Se muestran también los puntos correspondientes al incremento de temperatura superficial en el caso de control solo láser. Las líneas discontinuas muestran el mejor ajuste de los puntos experimentales a una recta. Las tres regiones indicadas en la gráfica corresponden a las densidades de potencia para las cuales el calentamiento fue insuficiente, adecuado y excesivo.

Los resultados correspondientes a la evolución del tamaño de los tumores tratados con diferentes densidades de potencia de irradiación se muestran en la **Figura 5.15 (a)**, mientras que los datos correspondientes a los diferentes casos control se muestran en la **Figura 5.15 (b)**. La densidad de potencia utilizada determinó la evolución posterior de los tumores tratados así como de los tumores control láser (PBS + láser), lo que nos permitió determinar tres rangos de densidades de potencia según su efecto sobre ellos. Estos tres rangos corresponden a las zonas delimitadas en la **Figura 5.14 (b)**:

- Para densidades de potencia bajas (inferiores a $1.7 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) el calentamiento generado durante el tratamiento fue insuficiente para producir un efecto terapéutico de ningún tipo. Como vemos en la **Figura 5.15 (a)**, los tumores irradiados con láser a 0.8 y $1.3 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ siguieron creciendo después del tratamiento. Este rango de densidades de potencias insuficientes para la terapia se corresponde con la parte izquierda de la **Figura 5.14 (b)**.
- El tratamiento a densidades de potencia intermedias (1.7 y $2.0 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$), por el contrario, sí produjo una eliminación efectiva del tumor. Sin embargo, la irradiación con estas intensidades no produjo ningún efecto sobre los tumores control láser, tal y como se puede ver en la **Figura 5.15 (b)**. El volumen del tumor control irradiado a $2.0 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$ se redujo levemente después del procedimiento, si bien esta tendencia se revirtió rápidamente, de forma que el tumor llegó a alcanzar en 13 días un volumen 4 veces superior al que presentaba el día del tratamiento. La evolución de dos tumores representativos, correspondientes al caso control PBS + láser ($1.7 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) y al tumor tratado con QDs y láser a la misma densidad de potencia, se muestra en la **Figura 5.15 (c) y (d)**. Se puede apreciar claramente que mientras el tumor ha seguido creciendo en el caso de control láser hasta el momento del sacrificio del ratón (día 13), el tumor que fue tratado con QDs + láser ha sido completamente eliminado, quedando únicamente una cicatriz superficial 22 días después de la terapia. Podemos concluir, por tanto, que el efecto terapéutico observado se debe a la combinación de QDs con irradiación a una densidad de potencia adecuada, en el rango que aparece sombreado en verde en la **Figura 5.14 (b)**.
- Para densidades de potencia más elevadas (superiores a $2.3 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) el calentamiento es muy elevado incluso en caso de control láser y el ratón sometido a la terapia completa sufrió una importante quemadura. La evolución de estos tumores no se muestra en la figura debido a que los ratones fueron sacrificados antes de la conclusión del experimento por razones éticas. Podemos considerar, por tanto, a este orden de densidades de potencia el tratamiento carece de selectividad ya que el láser por sí mismo es capaz de

dañar irreversiblemente los tejidos irradiados. Este rango se corresponde a la zona sombreada en rojo en la **Figura 5.14 (b)**.

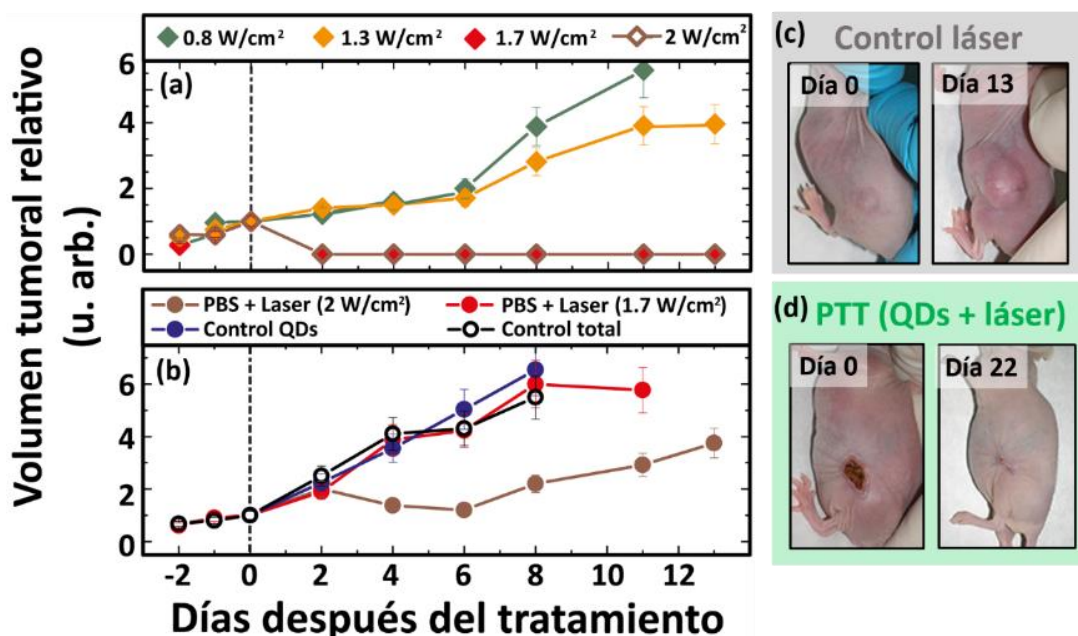


Figura 5.15. Evolución del volumen de los tumores tras la terapia fototérmica. (a) y (b) Volumen de los tumores tratados con QDs a distintas potencias láser (a) y de los distintos casos control (b) normalizados al valor que presentaban en día de la intervención. (c) y (d) Imágenes ópticas de los tumores inmediatamente después de la irradiación (808 nm, densidad de potencia de $1.7 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) y a la conclusión del experimento para el caso control láser (c) y el caso correspondiente al tratamiento completo (d).

Con los datos presentados en esta sección queda demostrado que los QDs de PbS/CdS/ZnS son buenos candidatos para llevar a cabo terapia fototérmica con control de la temperatura intratumoral en tiempo real. Queda demostrada, de nuevo, la importancia de controlar la temperatura en el interior del tumor en lugar de la superficial, ya que existe una marcada diferencia entre ambas.

Los resultados aquí mostrados constituyen una prueba de concepto; y estudios sistemáticos en los que se realice una evaluación estadística de la eficacia del tratamiento son necesarios para determinar la eficacia de los QDs de PbS/CdS/ZnS como agentes terapéuticos. Mediante estos estudios, se podrá determinar forma más precisa las densidades de potencia óptimas para llevar a cabo la terapia de forma

exitosa, así como estudiar el papel que puede jugar el ajuste dinámico del tratamiento para alcanzar la temperatura intratumoral deseada en todos los casos. No obstante, este enfoque sistemático no se ha podido abordar en el marco de esta tesis por limitaciones de tiempo y queda pendiente para futuros trabajos.

6. Conclusiones / Conclusions

En este capítulo se exponen, de forma resumida, los resultados principales obtenidos en el desarrollo de esta tesis doctoral.

En cuanto a la realización de imágenes de fluorescencia infrarroja *in vivo*, los resultados más destacados son los siguientes:

- Se ha caracterizado de forma sistemática la autofluorescencia infrarroja (900-1500 nm) *in vivo* bajo excitación con luz láser de 808 nm. Este estudio, realizado sobre ratones de cinco cepas diferentes, nos ha permitido determinar que existe una marcada dependencia de la autofluorescencia cutánea *in vivo* con la pigmentación, presentando los individuos de piel más oscura una señal mucho más intensa en todo el rango de emisión estudiado. También se ha caracterizado la autofluorescencia de los órganos, que resulta especialmente intensa en los órganos del tubo digestivo, en el hígado y en el bazo. Al contrario de lo que ocurría con la autofluorescencia cutánea, la observada en los órganos, que se puede atribuir a la presencia de diferentes pigmentos en los mismos, es independiente de la pigmentación del ratón. Se ha observado además que la intensidad de la señal de autofluorescencia disminuye en todos los casos al aumentar la longitud de onda, de manera que seleccionando longitudes de onda de detección superiores a 1200 nm es posible obtener imágenes de alto contraste sin un fondo debido a la autofluorescencia.
- Se ha diseñado un sistema experimental de filtrado espectral, basado en seleccionar el rango de detección del sistema de imagen a través de una rueda de filtros, que nos ha permitido obtener imágenes infrarrojas *in vivo* libres de autofluorescencia. Con este sistema, hemos podido realizar imágenes infrarrojas *in vivo* utilizando como agentes de contraste NPs dopadas con iones Nd^{3+} y QDs de PbS/CdS/ZnS y determinar a continuación su biodistribución *ex vivo*. Debido a la excelente relación señal/ruido alcanzada, este sistema también nos ha permitido estudiar la biodistribución *in vivo* en tiempo real de los QDs de PbS/CdS/ZnS.

- Adicionalmente, se ha diseñado un sistema experimental de filtrado temporal, para obtener imágenes *in vivo* de alto contraste en el infrarrojo, consistente en registrar únicamente las señales de vida media de fluorescencia más larga ($> 1 \mu\text{s}$). De esta forma, hemos podido eliminar la contribución de las señales de vida media más corta, como es el caso de todos los compuestos orgánicos responsables de la autofluorescencia. Con este sistema, hemos podido aislar con éxito la señal de fluorescencia proveniente de NPs de $\text{NaGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$, inoculadas en ratones por vía oral y por vía subcutánea, del fondo de autofluorescencia.
- Utilizando estos sistemas, hemos demostrado la capacidad de los nanocristales dopados con iones Nd^{3+} y los QDs de PbS/CdS/ZnS para actuar como agentes de contraste para imagen de fluorescencia en el infrarrojo.

En cuanto a los efectos biológicos, tanto *in vivo* como *in vitro*, de las NPs estudiadas en esta tesis, podemos extraer las siguientes conclusiones:

- Ninguna de las NPs estudiadas presenta un efecto tóxico apreciable sobre células HeLa a las concentraciones utilizadas en este trabajo.
- En cuanto a la biodistribución *in vivo*, para todas las NPs inyectadas por vía intravenosa se observa una rápida acumulación en los órganos del sistema reticuloendotelial (hígado y bazo). Esto se puede considerar una consecuencia de tres factores: la ausencia de recubrimiento superficial que aumente su tiempo de circulación, su tamaño ($> 5 \text{ nm}$), que impide que puedan ser eliminadas del organismo por vía renal y su carga superficial negativa. En el caso de los QDs de PbS/CdS/ZnS , los datos obtenidos *ex vivo* para un ratón parecen indicar una degradación de los QDs en el organismo resultante en una acumulación de metales pesados (Pb y Cd) en distintos órganos. Este resultado es compatible con la no aparición de efectos tóxicos apreciables teniendo en cuenta la baja concentración de QDs inyectada en los ratones.
- Ninguna de las NPs estudiadas para su aplicación *in vivo* presenta efectos tóxicos apreciables sobre los ratones salvo por las NPs de NdVO_4 , que dieron

lugar a la aparición de úlceras en los tumores en los que fueron inyectados. Dos sistemas (QDs de PbS/CdS/ZnS y NPs de NaGdF₄:Nd³⁺) fueron estudiados en mayor profundidad a través de experimentos en jaula metabólica, no observándose ningún efecto sobre la actividad física y metabólica de los ratones atribuible a las NPs.

En cuanto a la realización de terapia fototérmica controlada *in vivo* en modelos murinos de tumor, podemos destacar los siguientes resultados:

- Se ha demostrado la posibilidad de realizar con éxito terapia fototérmica *in vivo* utilizando NPs fuertemente dopadas con iones Nd³⁺, cuya capacidad calentadora reside en la alta concentración de iones Nd³⁺ dentro de cada NP.
- Se ha demostrado, asimismo, la capacidad de las NPs dopadas con iones Nd³⁺ (concretamente, NPs de LaF₃:Nd³⁺) de actuar simultáneamente como agentes calentadores y termométricos en terapia fototérmica. Monitorizando de forma continua la emisión de las NPs, cuya banda de emisión en torno a 890 nm cambia con la temperatura, hemos podido determinar en tiempo real la temperatura intratumoral durante un tratamiento de terapia fototérmica.
- De la misma forma, hemos realizado terapia fototérmica con éxito en un modelo murino de tumor utilizando QDs de PbS/CdS/ZnS, capaces de actuar también como nanotermómetros gracias a que la intensidad de su fluorescencia cae linealmente al aumentar la temperatura. Frente a las NPs de LaF₃:Nd³⁺, los QDs nos permitieron realizar terapia fototérmica a concentraciones y densidades de potencia más bajas. En el caso de los QDs, pudimos determinar, además, el rango de incrementos de temperatura intratumoral que resultó en una eliminación completa de los tumores estudiados: 35-50 °C.
- Los resultados obtenidos durante los experimentos de terapia fototérmica nos indican que la temperatura superficial registrada mediante termografía infrarroja es, en todos los casos, inferior a la temperatura intratumoral registrada a través de la fluorescencia de las NPs localizadas en el interior del

tumor. Para el caso de la terapia fototérmica con NPs de $\text{LaF}_3:\text{Nd}^{3+}$, obtuvimos un incremento de temperatura superficial un 20% inferior al intratumoral, mientras que en el caso de los QDs, fue de un 33%. Asimismo, observamos que los incrementos de temperatura no son idénticos para tumores irradiados en las mismas condiciones experimentales, debido muy probablemente a factores que no es posible controlar externamente (entorno vascular y área superficial del tumor, distribución de las NPs dentro del mismo...).

Los resultados presentados en esta tesis constituyen una contribución importante al desarrollo de la imagen *in vivo* en el infrarrojo. Se ha demostrado la posibilidad de obtener imágenes de alto contraste combinando NPs capaces de operar en las ventanas biológicas y sistemas experimentales que permitan eliminar la contribución de la autofluorescencia.

Se ha demostrado, asimismo, la posibilidad de realizar terapia fototérmica con control en tiempo real de la temperatura intratumoral, encontrándose diferencias notables entre ésta y la temperatura superficial medida a través de termografía infrarroja. Estos resultados indican que es posible utilizar un único material como agente fototérmico y termométrico para determinar de forma sencilla la temperatura en el tumor tratado. De esta forma, será posible maximizar la eficacia de la terapia fototérmica evitando incrementos de temperatura innecesariamente elevados que dañen de forma irreversible los tejidos sanos circundantes. Esto permitirá abordar los tratamientos fototérmicos *in vivo* de forma totalmente individualizada, ya que será posible realizar un ajuste dinámico de los parámetros del tratamiento manteniendo la temperatura en el rango deseado en todo momento.

In this chapter, the main results and findings obtained in this doctoral thesis will be summarized.

The most relevant results achieved concerning *in vivo* infrared bioimaging experiments are the following:

- The *in vivo* infrared autofluorescence, under excitation with 808 nm laser light, has been systematically studied in mice pertaining to five different strains. Through this study, we have been able to unequivocally associate the cutaneous *in vivo* autofluorescence to the pigmentation of the individuals. We have observed that a darker skin tone results in a much more intense emission signal throughout the whole wavelength range studied in this work. The intrinsic organ autofluorescence has also been studied and found to be completely independent of the cutaneous pigmentation of the individual. Organ autofluorescence intensity is markedly high in the digestive organs, as well as in the liver and spleen. Both cutaneous and organ autofluorescence intensity shows a decreasing trend with increasing wavelength, so that for wavelengths above 1200 nm it is possible to obtain autofluorescence-free high contrast images.
- In this doctoral thesis, a spectral filtering system for infrared bioimaging, consisting on selecting the detection range using a filter wheel, has been designed. This system has allowed for obtaining autofluorescence-free *in vivo* and *ex vivo* images. Namely, thanks to this system, it has been possible to determine the *ex vivo* biodistribution of Nd³⁺-doped NPs and QDs. The excellent signal-to-noise ratio even allowed for *in vivo* biodistribution studies using PbS/CdS/ZnS QDs.
- Additionally, a time filtering system for *in vivo* infrared bioimaging has also been designed and applied. This system is based on the selection of the fluorescence signal of longer fluorescence lifetimes (> 1 μ s). This system allows elimination of the shorter lifetime fluorescence signal, as is the case of the organic compounds responsible for the intrinsic autofluorescence of biological tissues. Using this system, it has been possible to successfully isolate the signal of NaGdF₄:Nd³⁺ NPs (inoculated both subcutaneously and orally into mice) from the autofluorescence background in highly-pigmented individuals.

- The application of these imaging systems has also allowed us to demonstrate the possibility of using Nd^{3+} -doped NPs and PbS/CdS/ZnS QDs as contrast agents for fluorescence bioimaging.

Concerning the biological effects of the NPs studied throughout this doctoral thesis, both *in vivo* and *in vitro*, de las NPs, the following conclusions can be drawn:

- None of the NPs presents a remarkable toxic effect on HeLa cells at the NP concentrations used in this work.
- Concerning the *in vivo* biodistribution, all the NPs injected intravenously show a fast uptake into the reticuloendotelial system (liver and spleen). Three factors need to be taken into account to explain this result: the lack of an adequate surface coating to increase the circulation time, their size ($< 5\text{nm}$), which prevents them from being cleared from the organism through the renal pathway and their negative surface charge. In the case of PbS/CdS/ZnS QDs, the *ex vivo* data collected for one of the intravenously injected mice indicates that the QDs are very likely experiencing a degradation process in the organism, which in turn causes a heavy metal (Pb and Cd) accumulation in several organs. This result is compatible with the lack of apparent toxic effects due to the very low QD concentration injected into the mice.
- None of the NPs studied for *in vivo* applications show remarkable toxic effects except for NdVO_4 NPs, which upon intratumoral injection gave rise to the appearance of ulcers. The biocompatibility of two of the nanomaterials studied in this work (PbS/CdS/ZnS QDs and $\text{aGdF}_4\text{:Nd}^{3+}$ NPs) was studied in greater depth through experiments in metabolic cages. No adverse effects were observed in the physical and metabolical activity of the mice.

Finally, the main results concerning *in vivo* photothermal therapy in mice models can be summarized in the following points:

- The possibility of performing *in vivo* photothermal therapy with Nd³⁺-doped NPs, whose heating capability is related to the high concentration of Nd³⁺ ions inside the NPs, has been demonstrated.
- Moreover, we have shown that Nd³⁺-doped NPs (namely, LaF₃:Nd³⁺ NPs) can act simultaneously as heating and thermal sensing agents during *in vivo* photothermal therapy. Thanks to the temperature sensitivity of the 890 nm emission band of LaF₃:Nd³⁺ NPs, it has been possible to determine intratumoral temperature in real time through continuous monitoring of the NP fluorescent emission.
- PbS/CdS/ZnS QDs have also been successfully applied for *in vivo* controlled photothermal therapy at lower concentrations and irradiation power densities than those used with LaF₃:Nd³⁺ NPs. These QDs present a temperature-sensitive fluorescence signal, whose intensity decreases linearly as the temperature increases. In addition, using these QDs, the intratumoral temperature range resulting in a successful elimination of the treated tumors could be determined (35-50 °C).
- The results obtained in the photothermal therapy experiments indicate that the skin surface temperature, obtained by infrared thermography, is in all cases lower than the intratumoral temperature (measured using the fluorescence of the NPs located inside the tumors). The difference between those temperatures was around 20%, in the case of the tumors treated with LaF₃:Nd³⁺ NPs and around 33% in the case of the tumors treated with QDs. During the photothermal therapy experiments, we observed that identical irradiation conditions did not result in identical temperature increments, which can be explained taking into account several factors that cannot be externally controlled (vascular environment and surface area of the tumor, distribution of NPs inside it...).

The results presented in this doctoral thesis constitute a significant contribution to the field of *in vivo* infrared imaging. The possibility of obtaining high contrast images

combining NPs operating in the BWs and experimental systems capable of removing the autofluorescence background has been demonstrated.

Moreover, the possibility of performing photothermal therapy with intratumoral temperature control in real time has been shown. This is particularly relevant as remarkable differences between skin surface and intratumoral temperatures have been found. The results presented in this thesis indicate that it is possible to use a single NP acting simultaneously as heating and thermal sensing agent so that the temperature at the treated tumor can be easily determined. Real-time temperature control during photothermal therapy will allow a maximization of the efficacy of the treatment, as undesired temperature increments resulting in an excessive damage of the healthy tissues surrounding the tumor will be avoided. Additionally, this will allow for a completely individualized approach of photothermal treatments, as the irradiation parameters could be dynamically adjusted during the procedure so as to maintain the temperature in the desired range throughout the therapy.

Bibliografía

Aigouy, L., Tessier, G., Mortier, M. and Charlot, B. (2005). "Scanning thermal imaging of microelectronic circuits with a fluorescent nanoprobe." Applied Physics Letters **87**(18): 184105.

Alivisatos, A. P. (1996). "Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals." The Journal of Physical Chemistry **100**(31): 13226-13239.

Allison, S. and Gillies, G. (1997). "Remote thermometry with thermographic phosphors: instrumentation and applications." Review of Scientific Instruments **68**(7): 2615-2650.

Andersson-Engels, S., af Klinteberg, C., Svanberg, K. and Svanberg, S. (1997). "In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics." Physics in medicine and biology **42**(5): 815.

Andreakou, P., Brossard, M., Li, C., Bernechea, M., Konstantatos, G. and Lagoudakis, P. G. (2013). "Size- and temperature-dependent carrier dynamics in oleic acid capped PbS quantum dots." The Journal of Physical Chemistry C **117**(4): 1887-1892.

Anselmo, A. C. and Mitragotri, S. (2016). "Nanoparticles in the clinic." Bioengineering & Translational Medicine.

Arai, S., Ferdinandus, Takeoka, S., Ishiwata, S. i., Sato, H. and Suzuki, M. (2015). "Micro-thermography in millimeter-scale animals by using orally-dosed fluorescent nanoparticle thermosensors." Analyst **140**(22): 7534-7539.

Ballou, B., Lagerholm, B. C., Ernst, L. A., Bruchez, M. P. and Waggoner, A. S. (2004). "Noninvasive Imaging of Quantum Dots in Mice." Bioconjugate Chemistry **15**(1): 79-86.

Barry, P. (1975). "A comparison of concentrations of lead in human tissues." British Journal of Industrial Medicine **32**(2): 119-139.

Bashkatov, A., Genina, E., Kochubey, V. and Tuchin, V. (2005). "Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm." Journal of Physics D: Applied Physics **38**(15): 2543.

Bednarkiewicz, A., Wawrzynczyk, D., Nyk, M. and Strek, W. (2010). "Optically stimulated heating using Nd³⁺ doped NaYF₄ colloidal near infrared nanophosphors." Applied Physics B **103**(4): 847-852.

Benayas, A., del Rosal, B., Pérez-Delgado, A., Santacruz-Gómez, K., Jaque, D., Hirata, G. A. and Vetrone, F. (2015). "Nd:YAG Near-Infrared Luminescent Nanothermometers." Advanced Optical Materials **3**(5): 687-694.

Benayas, A., Ren, F., Carrasco, E., Marzal, V., del Rosal, B., Gonfa, B. A., Juarranz, Á., Sanz-Rodríguez, F., Jaque, D. and García-Solé, J. (2015). "PbS/CdS/ZnS Quantum Dots: A Multifunctional Platform for In Vivo Near-Infrared Low-Dose Fluorescence Imaging." Advanced Functional Materials **25**(42): 6650-6659.

- Berezin, M. Y. and Achilefu, S. (2010). "Fluorescence lifetime measurements and biological imaging." Chemical Reviews **110**(5): 2641-2684.
- Berridge, M. V., Herst, P. M. and Tan, A. S. (2005). "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction." Biotechnology annual review **11**: 127-152.
- Biju, V., Itoh, T. and Ishikawa, M. (2010). "Delivering quantum dots to cells: bioconjugated quantum dots for targeted and nonspecific extracellular and intracellular imaging." Chemical Society Reviews **39**(8): 3031-3056.
- Bouzigues, C., Gacoin, T. and Alexandrou, A. (2011). "Biological Applications of Rare-Earth Based Nanoparticles." ACS Nano **5**(11): 8488-8505.
- Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S. and Alivisatos, A. P. (1998). "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels." Science **281**(5385): 2013-2016.
- Brzóska, M. and Moniuszko-Jakoniuk, J. (2001). "Interactions between cadmium and zinc in the organism." Food and Chemical Toxicology **39**(10): 967-980.
- Bullen, C. and Mulvaney, P. (2006). "The effects of chemisorption on the luminescence of CdSe quantum dots." Langmuir **22**(7): 3007-3013.
- Collins, A., Ring, E., Cosh, J. and Bacon, P. (1974). "Quantitation of thermography in arthritis using multi-isothermal analysis. I. The thermographic index." Annals of the rheumatic diseases **33**(2): 113.
- Collins, J. (2013). Principles and Applications of Rare Earth Ion-Doped Nanoparticles. Nano-Optics for Enhancing Light-Matter Interactions on a Molecular Scale: Plasmonics, Photonic Materials and Sub-Wavelength Resolution. B. Di Bartolo and J. Collins. Dordrecht, Springer Netherlands: 315-332.
- Cowles, E. A., Kovar, J. L., Curtis, E. T., Xu, H. and Othman, S. F. (2013). "Near-Infrared Optical Imaging for Monitoring the Regeneration of Osteogenic Tissue-Engineered Constructs." BioResearch Open Access **2**(3): 186-191.
- Cui, X., She, J., Gao, C., Cui, K., Hou, C., Wei, W. and Peng, B. (2010). "Luminescent properties of Nd³⁺-doped LaF₃ core/shell nanoparticles with enhanced near infrared (NIR) emission." Chemical Physics Letters **494**(1): 60-63.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. and Prasher, D. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-805.
- Chen, G., Ohulchanskyy, T. Y., Liu, S., Law, W.-C., Wu, F., Swihart, M. T., Ågren, H. and Prasad, P. N. (2012). "Core/Shell NaGdF₄:Nd³⁺/NaGdF₄ Nanocrystals with Efficient Near-Infrared to Near-Infrared Downconversion Photoluminescence for Bioimaging Applications." ACS Nano **6**(4): 2969-2977.
- Chen, H., Shao, L., Ming, T., Sun, Z., Zhao, C., Yang, B. and Wang, J. (2010). "Understanding the Photothermal Conversion Efficiency of Gold Nanocrystals." Small **6**(20): 2272-2280.

Chen, M., Fang, X., Tang, S. and Zheng, N. (2012). "Polypyrrole nanoparticles for high-performance in vivo near-infrared photothermal cancer therapy." Chemical Communications **48**(71): 8934-8936.

Chicheł, A., Skowronek, J., Kubaszewska, M. and Kanikowski, M. (2007). "Hyperthermia—description of a method and a review of clinical applications." Reports of Practical Oncology & Radiotherapy **12**(5): 267-275.

Dabbousi, B., Rodriguez-Viejo, J., Mikulec, F. V., Heine, J., Mattoussi, H., Ober, R., Jensen, K. and Bawendi, M. (1997). "(CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites." The Journal of Physical Chemistry B **101**(46): 9463-9475.

Dai, Q., Zhang, Y., Wang, Y., Hu, M. Z., Zou, B., Wang, Y. and Yu, W. W. (2010). "Size-Dependent Temperature Effects on PbSe Nanocrystals." Langmuir **26**(13): 11435-11440.

de Mello Donegá, C. (2011). "Synthesis and properties of colloidal heteronanocrystals." Chemical Society Reviews **40**(3): 1512-1546.

del Rosal, B., Pérez-Delgado, A., Misiak, M., Bednarkiewicz, A., Vanetsev, A. S., Orlovskii, Y., Jovanović, D. J., Dramićanin, M. D., Rocha, U. and Kumar, K. U. (2015). "Neodymium-doped nanoparticles for infrared fluorescence bioimaging: The role of the host." Journal of Applied Physics **118**(14): 143104.

del Rosal, B., Ximendes, E., Rocha, U. and Jaque, D. (2016). "In Vivo Luminescence Nanothermometry: from Materials to Applications." Advanced Optical Materials.

Dieke, G. H., Crosswhite, H. M. and Crosswhite, H. (1968). Spectra and energy levels of rare earth ions in crystals, Interscience Publishers New York.

Donner, J. S., Thompson, S. A., Alonso-Ortega, C., Morales, J., Rico, L. G., Santos, S. I. C. O. and Quidant, R. (2013). "Imaging of Plasmonic Heating in a Living Organism." ACS Nano **7**(10): 8666-8672.

Dreher, D. and Junod, A. F. (1996). "Role of oxygen free radicals in cancer development." European Journal of Cancer **32**(1): 30-38.

Frangioni, J. V. (2003). "In vivo near-infrared fluorescence imaging." Current Opinion in Chemical Biology **7**(5): 626-634.

Frassinetti, S., Bronzetti, G., Caltavuturo, L., Cini, M. and Croce, C. D. (2006). "The role of zinc in life: a review." Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology **25**(3): 597.

Gao, X., Yang, L., Petros, J. A., Marshall, F. F., Simons, J. W. and Nie, S. (2005). "In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots." Current opinion in biotechnology **16**(1): 63-72.

Gao, X. H., Cui, Y. Y., Levenson, R. M., Chung, L. W. K. and Nie, S. M. (2004). "In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots." Nature Biotechnology **22**(8): 969-976.

- Gioux, S., Choi, H. S. and Frangioni, J. V. (2010). "Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation." Molecular Imaging **9**(5): 237.
- Habash, R. W., Bansal, R., Krewski, D. and Alhafid, H. T. (2006). "Thermal therapy, part 1: an introduction to thermal therapy." Critical Reviews in Biomedical Engineering **34**(6): 459-489.
- Han, B., Hanson, W. L., Bensalah, K., Tuncel, A., Stern, J. M. and Cadeddu, J. A. (2009). "Development of quantum dot-mediated fluorescence thermometry for thermal therapies." Annals of Biomedical Engineering **37**(6): 1230-1239.
- Han, X., Lui, H., McLean, D. I. and Zeng, H. (2009). "Near-infrared autofluorescence imaging of cutaneous melanins and human skin in vivo." Journal of Biomedical Optics **14**(2): 024017-024017-024015.
- Hauck, T. S., Anderson, R. E., Fischer, H. C., Newbigging, S. and Chan, W. C. W. (2010). "In vivo Quantum-Dot Toxicity Assessment." Small **6**(1): 138-144.
- Hauser, A. K., Wydra, R. J., Stocke, N. A., Anderson, K. W. and Hilt, J. Z. (2015). "Magnetic nanoparticles and nanocomposites for remote controlled therapies." Journal of Controlled Release **219**: 76-94.
- Hebbink, G. A., Stouwdam, J. W., Reinhoudt, D. N. and Van Veggel, F. C. (2002). "Lanthanide (III)-Doped Nanoparticles That Emit in the Near-Infrared." Advanced Materials **14**(16): 1147-1150.
- Henderson, B. and Imbusch, G. (1989). "Optical Spectroscopy of Inorganic Solids." Oxford Science Oxford.
- Hong, G., Lee, J. C., Robinson, J. T., Raaz, U., Xie, L., Huang, N. F., Cooke, J. P. and Dai, H. (2012). "Multifunctional in vivo vascular imaging using near-infrared II fluorescence." Nature Medicine **18**(12): 1841-1846.
- Hong, G., Robinson, J. T., Zhang, Y., Diao, S., Antaris, A. L., Wang, Q. and Dai, H. (2012). "In Vivo Fluorescence Imaging with Ag₂S Quantum Dots in the Second Near-Infrared Region." Angewandte Chemie International Edition **51**(39): 9818-9821.
- Hong, G. S., Diao, S., Chang, J. L., Antaris, A. L., Chen, C. X., Zhang, B., Zhao, S., Atochin, D. N., Huang, P. L., Andreasson, K. I., Kuo, C. J. and Dai, H. J. (2014). "Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window." Nature Photonics **8**(9): 723-730.
- Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. and El-Sayed, M. A. (2008). "Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles." Lasers in Medical Science **23**(3): 217-228.
- Huang, Z., Zeng, H., Hamzavi, I., Alajlan, A., Tan, E., McLean, D. I. and Lui, H. (2006). "Cutaneous melanin exhibiting fluorescence emission under near-infrared light excitation." Journal of Biomedical Optics **11**(3): 034010-034010-034016.
- Hufner, S. (2012). Optical spectra of transparent rare earth compounds, Elsevier.

Inoue, Y., Izawa, K., Kiryu, S., Tojo, A. and Ohtomo, K. (2008). "Diet and abdominal autofluorescence detected by in vivo fluorescence imaging of living mice." Molecular imaging **7**(1): 7290.2008. 0003.

Jacques, S. L. (2013). "Optical properties of biological tissues: A review." Physics in Medicine and Biology **58**(11): R37-R61.

James, F. H., Daniel, N. S. and Henry, M. S. (2004). "The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice." Physics in Medicine and Biology **49**(18): N309.

Jaque, D., Martinez Maestro, L., del Rosal, B., Haro-Gonzalez, P., Benayas, A., Plaza, J. L., Martin Rodriguez, E. and Garcia Sole, J. (2014). "Nanoparticles for photothermal therapies." Nanoscale **6**(16): 9494-9530.

Jaque, D., Rosal, B. d., Rodríguez, E. M., Maestro, L. M., Haro-González, P. and Solé, J. G. (2014). "Fluorescent nanothermometers for intracellular thermal sensing." Nanomedicine **9**(7): 1047-1062.

Jaque, D. and Vetrone, F. (2012). "Luminescence nanothermometry." Nanoscale **4**(15): 4301-4326.

Jaque Garcia, D. and Garcia Sole, J. (2016). Chapter 4 Quantum Dot Fluorescence Thermometry. Thermometry at the Nanoscale: Techniques and Selected Applications, The Royal Society of Chemistry: 83-123.

Jing, P., Zheng, J., Ikezawa, M., Liu, X., Lv, S., Kong, X., Zhao, J. and Masumoto, Y. (2009). "Temperature-dependent photoluminescence of CdSe-core CdS/CdZnS/ZnS-multishell quantum dots." The Journal of Physical Chemistry C **113**(31): 13545-13550.

Klimov, V., Bolivar, P. H. and Kurz, H. (1996). "Ultrafast carrier dynamics in semiconductor quantum dots." Physical Review B **53**(3): 1463.

Klimov, V. I. (2007). "Spectral and dynamical properties of multiexcitons in semiconductor nanocrystals." Annual Review of Physical Chemistry **58**: 635-673.

Koechner, W. (2013). Solid-state laser engineering, Springer.

Koole, R., Groeneveld, E., Vanmaekelbergh, D., Meijerink, A. and de Mello Donegá, C. (2014). Size Effects on Semiconductor Nanoparticles. Nanoparticles: Workhorses of Nanoscience. C. de Mello Donegá. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 13-51.

Kumar, G., Chen, C., Ballato, J. and Riman, R. (2007). "Optical characterization of infrared emitting rare-earth-doped fluoride nanocrystals and their transparent nanocomposites." Chemistry of materials **19**(6): 1523-1528.

Lee, D.-E., Koo, H., Sun, I.-C., Ryu, J. H., Kim, K. and Kwon, I. C. (2012). "Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis." Chemical Society Reviews **41**(7): 2656-2672.

- Li, B., Wang, Q., Zou, R., Liu, X., Xu, K., Li, W. and Hu, J. (2014). "Cu_{7.2}S₄ nanocrystals: a novel photothermal agent with a 56.7% photothermal conversion efficiency for photothermal therapy of cancer cells." Nanoscale **6**(6): 3274-3282.
- Lim, Y. T., Kim, S., Nakayama, A., Stott, N. E., Bawendi, M. G. and Frangioni, J. V. (2003). "Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging." Molecular imaging **2**(1): 50-64.
- Liong, M., Lu, J., Kovochich, M., Xia, T., Ruehm, S. G., Nel, A. E., Tamanoi, F. and Zink, J. I. (2008). "Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery." ACS Nano **2**(5): 889-896.
- Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp and A. Kenworthy (2001). "Studying protein dynamics in living cells." Nature Reviews Molecular Cell Biology **2**(6): 444-456
- Longmire, M., Choyke, P. L. and Kobayashi, H. (2008). "Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats." Nanomedicine **3**(5): 703-717.
- Maestro, L. M., Rodríguez, E. M. n., Rodríguez, F. S., la Cruz, M. I.-d., Juarranz, A., Naccache, R., Vetrone, F., Jaque, D., Capobianco, J. A. and Solé, J. G. a. (2010). "CdSe quantum dots for two-photon fluorescence thermal imaging." Nano Letters **10**(12): 5109-5115.
- Mancini, M. C., Kairdolf, B. A., Smith, A. M. and Nie, S. (2008). "Oxidative quenching and degradation of polymer-encapsulated quantum dots: new insights into the long-term fate and toxicity of nanocrystals in vivo." Journal of the American Chemical Society **130**(33): 10836-10837.
- Martínez Maestro, L. (2015). "Puntos cuánticos como nanotermómetros luminiscentes: Hipertermia plasmónica controlada." Tesis doctoral UAM.
- Mialon, G., Turkcan, S., Alexandrou, A., Gacoin, T. and Boilot, J.-P. (2009). "New insights into size effects in luminescent oxide nanocrystals." The Journal of Physical Chemistry C **113**(43): 18699-18706.
- Michalet, X., Pinaud, F., Lacoste, T. D., Dahan, M., Bruchez, M. P., Alivisatos, A. P. and Weiss, S. (2001). "Properties of fluorescent semiconductor nanocrystals and their application to biological labeling." Single Molecules **2**(4): 261-276.
- Morello, G., De Giorgi, M., Kudera, S., Manna, L., Cingolani, R. and Anni, M. (2007). "Temperature and size dependence of nonradiative relaxation and exciton-phonon coupling in colloidal CdTe quantum dots." The Journal of Physical Chemistry C **111**(16): 5846-5849.
- Naccache, R., Vetrone, F., Mahalingam, V., Cuccia, L. A. and Capobianco, J. A. (2009). "Controlled synthesis and water dispersibility of hexagonal phase NaGdF₄:Ho³⁺/Yb³⁺ nanoparticles." Chemistry of Materials **21**(4): 717-723.
- Nambiar, K. (2006). Lasers: Principles, Types and Applications, New Age International.

- Ng, E.-K. (2009). "A review of thermography as promising non-invasive detection modality for breast tumor." International Journal of Thermal Sciences **48**(5): 849-859.
- Nguyen, Q. T., Olson, E. S., Aguilera, T. A., Jiang, T., Scadeng, M., Ellies, L. G. and Tsien, R. Y. (2010). "Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(9): 4317-4322.
- Ntziachristos, V., Ripoll, J. and Weissleder, R. (2002). "Would near-infrared fluorescence signals propagate through large human organs for clinical studies?" Optics Letters **27**(5): 333-335.
- Okabe, K., Inada, N., Gota, C., Harada, Y., Funatsu, T. and Uchiyama, S. (2012). "Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy." Nature Communications **3**: 705.
- Olkhovets, A., Hsu, R. C., Lipovskii, A. and Wise, F. W. (1998). "Size-Dependent Temperature Variation of the Energy Gap in Lead-Salt Quantum Dots." Physical Review Letters **81**(16): 3539-3542.
- Orlovskii, Y. V., Popov, A. V., Platonov, V. V., Fedorenko, S. G., Sildos, I. and Osipov, V. V. (2013). "Fluctuation kinetics of fluorescence hopping quenching in the Nd³⁺:Y₂O₃ spherical nanoparticles." Journal of Luminescence **139**: 91-97.
- Pansare, V. J., Hejazi, S., Faenza, W. J. and Prud'homme, R. K. (2012). "Review of long-wavelength optical and NIR imaging materials: contrast agents, fluorophores, and multifunctional nano carriers." Chemistry of Materials **24**(5): 812-827.
- Patterson, A. P., Booth, S. A. and Saba, R. (2014). "The emerging use of in vivo optical imaging in the study of neurodegenerative diseases." BioMed Research International **2014**.
- Pedroni, M., Piccinelli, F., Passuello, T., Polizzi, S., Ueda, J., Haro-González, P., Martinez Maestro, L., Jaque, D., García-Solé, J., Bettinelli, M. and Speghini, A. (2013). "Water (H₂O and D₂O) Dispersible NIR-to-NIR Upconverting Yb³⁺/Tm³⁺ Doped MF₂ (M = Ca, Sr) Colloids: Influence of the Host Crystal." Crystal Growth & Design **13**(11): 4906-4913.
- Prasad, P. N. (2004). Nanophotonics, John Wiley & Sons.
- Quintanilla, M., Benayas, A., Naccache, R. and Vetrone, F. (2016). Chapter 5 Luminescent Nanothermometry with Lanthanide-doped Nanoparticles. Thermometry at the Nanoscale: Techniques and Selected Applications, The Royal Society of Chemistry: 124-166.
- Quintanilla, M., Cantelar, E., Cussó, F., Villegas, M. and Caballero, A. C. (2011). "Temperature sensing with up-converting submicron-sized LiNbO₃:Er³⁺/Yb³⁺ particles." Applied Physics Express **4**(2): 022601.
- Quintanilla, M., Núñez, N. O., Cantelar, E., Ocaña, M. and Cussó, F. (2013). "Energy transfer efficiency in YF₃ nanocrystals: Quantifying the Yb³⁺ to Tm³⁺ infrared dynamics." Journal of Applied Physics **113**(17): 174308.

Reiss, P., Protiere, M. and Li, L. (2009). "Core/shell semiconductor nanocrystals." Small **5**(2): 154-168.

Ren, F., Zhao, H., Vetrone, F. and Ma, D. (2013). "Microwave-assisted cation exchange toward synthesis of near-infrared emitting PbS/CdS core/shell quantum dots with significantly improved quantum yields through a uniform growth path." Nanoscale **5**(17): 7800-7804.

Rocha, U., Jacinto, C., Silva, W. F., Guedes, I., Benayas, A., Maestro, L. M., Elias, M. A., Bovero, E., van Veggel, F., Sole, J. A. G. and Jaque, D. (2013). "Subtissue Thermal Sensing Based on Neodymium-Doped LaF₃ Nanoparticles." ACS Nano **7**(2): 1188-1199.

Rocha, U., Upendra Kumar, K., Jacinto, C., Ramiro, J., Caamaño, A. J., García Solé, J. and Jaque, D. (2014). "Nd³⁺ doped LaF₃ nanoparticles as self-monitored photo-thermal agents." Applied Physics Letters **104**(5): 053703.

Saccomandi, P., Schena, E. and Silvestri, S. (2013). "Techniques for temperature monitoring during laser-induced thermotherapy: An overview." International Journal of Hyperthermia **29**(7): 609-619.

Savchuk, O. A., Carvajal, J., Massons, J., Aguiló, M. and Díaz, F. (2016). "Determination of photothermal conversion efficiency of graphene and graphene oxide through an integrating sphere method." Carbon **103**: 134-141.

Sharma, P., Brown, S., Walter, G., Santra, S. and Moudgil, B. (2006). "Nanoparticles for bioimaging." Advances in Colloid and Interface Science **123-126**: 471-485.

Shen, S., Tang, H., Zhang, X., Ren, J., Pang, Z., Wang, D., Gao, H., Qian, Y., Jiang, X. and Yang, W. (2013). "Targeting mesoporous silica-encapsulated gold nanorods for chemophotothermal therapy with near-infrared radiation." Biomaterials **34**(12): 3150-3158.

Snitzer, E. (1961). "Optical maser action of Nd³⁺ in a barium crown glass." Physical Review Letters **7**(12): 444.

Stouwdam, J. W., Hebbink, G. A., Huskens, J. and van Veggel, F. C. J. M. (2003). "Lanthanide-Doped Nanoparticles with Excellent Luminescent Properties in Organic Media." Chemistry of Materials **15**(24): 4604-4616.

Svelto, O. and Hanna, D. C. (1976). Principles of lasers, Springer.

Takahashi, I., Emi, Y., Hasuda, S., Kakeji, Y., Maehara, Y. and Sugimachi, K. (2002). "Clinical application of hyperthermia combined with anticancer drugs for the treatment of solid tumors." Surgery **131**(1): S78-S84.

Tanner, P. (2005). "Synthesis and luminescence of nano-insulators doped with lanthanide ions." Journal of nanoscience and nanotechnology **5**(9): 1455-1464.

Tomczak, N., Jańczewski, D., Han, M. and Vancso, G. J. (2009). "Designer polymer-quantum dot architectures." Progress in Polymer Science **34**(5): 393-430.

Toutouzas, K., Drakopoulou, M., Dilaveris, P., Vaina, S., Gatzoulis, K., Karabelas, J., Riga, M., Stefanadi, E., Synetos, A., Vlasits, K. and Stefanadis, C. (2009). "Inflammation in lone

atrial fibrillation: New insights by coronary sinus thermography." International Journal of Cardiology **134**(3): 345-350.

Troy, T., Jekic-McMullen, D., Sambucetti, L. and Rice, B. (2004). "Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models." Molecular Imaging **3**(1): 9-23.

Vahrmeijer, A. L., Hutteman, M., van der Vorst, J. R., van de Velde, C. J. and Frangioni, J. V. (2013). "Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence." Nature Reviews Clinical Oncology **10**(9): 507-518.

Valerini, D., Creti, A., Lomascolo, M., Manna, L., Cingolani, R. and Anni, M. (2005). "Temperature dependence of the photoluminescence properties of colloidal CdSe/ZnS core/shell quantum dots embedded in a polystyrene matrix." Physical Review B **71**(23): 235409.

Vetrone, F., Naccache, R., Zamarrón, A., Juarranz de la Fuente, A., Sanz-Rodríguez, F., Martínez Maestro, L., Martín Rodríguez, E., Jaque, D., García Solé, J. and Capobianco, J. A. (2010). "Temperature Sensing Using Fluorescent Nanothermometers." ACS Nano **4**(6): 3254-3258.

Walker, G. W., Sundar, V. C., Rudzinski, C. M., Wun, A. W., Bawendi, M. G. and Nocera, D. G. (2003). "Quantum-dot optical temperature probes." Applied Physics Letters **83**(17): 3555-3557.

Wang, F., Zhang, Y., Fan, X. and Wang, M. (2006). "Facile synthesis of water-soluble LaF₃: Ln³⁺ nanocrystals." Journal of Materials Chemistry **16**(11): 1031-1034.

Wang, S., Westcott, S. and Chen, W. (2002). "Nanoparticle luminescence thermometry." The Journal of Physical Chemistry B **106**(43): 11203-11209.

Wawrzynczyk, D., Bednarkiewicz, A., Nyk, M., Strek, W. and Samoc, M. (2012). "Neodymium(III) doped fluoride nanoparticles as non-contact optical temperature sensors." Nanoscale **4**(22): 6959-6961.

Weissleder, R. and Pittet, M. J. (2008). "Imaging in the era of molecular oncology." Nature **452**(7187): 580-589.

Welsher, K., Sherlock, S. P. and Dai, H. (2011). "Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(22): 8943-8948.

Wust, P., Hildebrandt, B., Sreenivasa, G., Rau, B., Gellermann, J., Riess, H., Felix, R. and Schlag, P. (2002). "Hyperthermia in combined treatment of cancer." The Lancet Oncology **3**(8): 487-497.

Wybourne, B. G. (1965). Spectroscopic properties of rare earths, Interscience New York.

- Xu, J., Hu, C., Liu, G., Liu, H., Du, G. and Zhang, Y. (2011). "Synthesis and visible-light photocatalytic activity of NdVO_4 nanowires." Journal of Alloys and Compounds **509**(30): 7968-7972.
- Yang, J.-M., Yang, H. and Lin, L. (2011). "Quantum Dot Nano Thermometers Reveal Heterogeneous Local Thermogenesis in Living Cells." ACS Nano **5**(6): 5067-5071.
- Yang, K., Zhang, S., Zhang, G., Sun, X., Lee, S. T. and Liu, Z. (2010). "Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy." Nano Letters **10**(9): 3318-3323.
- Yang, W., Lowe-Webb, R. R., Lee, H. and Sercel, P. C. (1997). "Effect of carrier emission and retrapping on luminescence time decays in InAs/GaAs quantum dots." Physical Review B **56**(20): 13314.
- Ye, L., Yong, K.-T., Liu, L., Roy, I., Hu, R., Zhu, J., Cai, H., Law, W.-C., Liu, J. and Wang, K. (2012). "A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots." Nature Nanotechnology **7**(7): 453-458.
- Yu, M. and Zheng, J. (2015). "Clearance pathways and tumor targeting of imaging nanoparticles." ACS Nano **9**(7): 6655-6674.
- Yu, X. F., Chen, L. D., Li, M., Xie, M. Y., Zhou, L., Li, Y. and Wang, Q. Q. (2008). "Highly efficient fluorescence of $\text{NdF}_3/\text{SiO}_2$ core/shell nanoparticles and the applications for in vivo NIR detection." Advanced Materials **20**(21): 4118-4123.
- Zhao, Y., Riemersma, C., Pietra, F., Koole, R., de Mello Donegá, C. and Meijerink, A. (2012). "High-temperature luminescence quenching of colloidal quantum dots." ACS Nano **6**(10): 9058-9067.
- Zohar, O., Ikeda, M., Shinagawa, H., Inoue, H., Nakamura, H., Elbaum, D., Alkon, D. L. and Yoshioka, T. (1998). "Thermal imaging of receptor-activated heat production in single cells." Biophysical journal **74**(1): 82-89.